

RECEPTOR PROTEIN FOR PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE

Patent number: JP61293924
Publication date: 1986-12-24
Inventor: NIITSU YOJIRO; others: 02
Applicant: ASAHI CHEM IND CO LTD
Classification:
- **International:** A61K37/02; A61K35/12; A61K35/74; A61K37/04;
C07K15/06; C12P21/00
- **European:**
Application number: JP19850136729 19850623
Priority number(s):

Abstract of JP61293924

PURPOSE: To provide the titled receptor protein having the properties of novel cancer-specific antigen common to a wide variety of cancer cells and useful as an antigen to obtain an antibody for the development of novel method for the diagnosis and remedy for cancer.

CONSTITUTION: The receptor protein of physiologically active substance (e.g. rabbit TNF, human TNF, etc.), having cytotoxic activity against L-M cell and causing hemorrhagic necrosis reaction to the tumor part when administered to BALB/c mouse transplanted with Meth A Sarcoma cancer cell. The protein has a molecular weight of 95,000+ or -10,000 (SDS-polyacrylamide electrophoresis) and forms a both with a physiologically active substance having a dissociation constant of 1×10^{-9} - 1×10^{-10} . It can be separated by subjecting the membrane fraction of a cell sensitive to the physiological active substance to the purification process including the affinity chromatography using an affinity adsorbent produced by immobilizing said physiologically active substance on a carrier.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭61-293924

⑤Int.Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	⑬公開 昭和61年(1986)12月24日
A 61 K 37/02		7138-4C	
35/12		7138-4C	
35/74		7138-4C	
37/04		7138-4C	
C 07 K 15/06		8318-4H	
C 12 P 21/00		6712-4B	
// C 12 N 15/00		7115-4B	審査請求 未請求 発明の数 5 (全44頁)

④発明の名称 生理活性物質の受容タンパク

②特 願 昭60-136729
 ②出 願 昭60(1985)6月23日

③発明者 新津 洋 司郎 札幌市中央区北1条西15丁目 大通ハイム601号
 ③発明者 漆崎 一朗 札幌市中央区双子山2丁目4
 ③発明者 林 紘 富士市今泉3989の1
 ④出願人 旭化成工業株式会社 大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

明細書

1. 発明の名称

生理活性物質の受容タンパク

2. 特許請求の範囲

(1) L-M細胞に対して細胞障害性を有し且つ
 メス エイ ザルコーマ (Reth A Sarcoma) 痘細
 胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその
 肿瘍部位に出血性壞死反応を起こさせる性質を有
 する生理活性物質の受容タンパク。
 (2) 该生理活性物質がTNFであることを特徴と
 する特許請求の範囲第1項記載の受容タンパク。
 (3) 该生理活性物質が遺伝子組換体より生産
 されたものであることを特徴とする特許請求範囲
 第1項又は第2項記載の受容タンパク。
 (4)

a) 分子量 96,000±10,000 (SDS-ポリアク
 リルアミド電気泳動法)

b) 生理活性物質との結合における解離定数

$1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-14}$

の特性を有することを特徴とする特許請求の範囲
 第1~3項のいずれかに記載の受容タンパク。

(5) L-M細胞に対して細胞障害性を有し、か
 つメス エイ ザルコーマ 痘細胞を移植したBALB
 /cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性
 壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質
 に感受性のある細胞より単離された該生理活性物
 質受容タンパク。

(6) 该生理活性物質がTNFであることを特徴と
 する特許請求の範囲第5項記載の受容タンパク。

(7) 生理活性物質に感受性のある細胞が寄生細
 物由来であることを特徴とする特許請求の範囲第
 5項又は第6項記載の受容タンパク。

(8) L-M細胞に対して細胞障害性を有し、且
 つメス エイ ザルコーマ 痘細胞を移植したBALB
 /cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性
 壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質
 に感受性のある細胞から得た該感受性細胞の膜画
 分を該生理活性物質を担体に固定させて得られる
 緩和性吸着体を用いるアフィニティーコロマトグ

ラフィーを含む精製処理に付すことを特徴とする該生理活性物質の受容タンパクの単離方法。

(8) 該生理活性物質がTNFであることを特徴とする特許請求の範囲第10項記載の方法。

(10) 生理活性物質に感受性のある細胞が脊椎動物由来であることを特徴とする特許請求の範囲第8項 又は第9項のいずれかに記載の方法。

(11) L-M細胞に対して細胞障害性を有し且つメス エイ ザルコーマ癌細胞を移植した BALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こせる性質を有する生理活性物質の受容タンパクに対する抗体。

(12) L-M細胞に対して細胞障害性を有し且つメス エイ ザルコーマ癌細胞を移植した BALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こせる性質を有する生理活性物質に対する抗体の放射性元素標識体。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、生理活性物質の受容タンパクに関するものである。更に詳細には、本発明は、L-M細

胞に対して細胞障害性を有しかつメス エイ ザルコーマ(Meth A Sarcoma)癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こせる性質を有する生理活性物質の受容タンパクに関するものである。

本明細書において、アミノ酸、ペプチドはIUPAC-IUB生化学命名委員会(CBN)で採用された略記法により表示され、例えば下記の略号が使用される。なお、アミノ酸などに關し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

Cys : システイン残基

Gln : グルタミン残基

Asp : アスパラギン酸残基

Pro : プロリン残基

Tyr : チロシン残基

Val : バリン残基

Lys : リジン残基

Glu : グルタミン酸残基

Ala : アラニン残基

Asn : アスパラギン残基

Leu : ロイシン残基

Phe : フェニルアラニン残基

Gly : グリシン残基

His : ヒスチジン残基

Ser : セリン残基

Thr : スレオニン残基

Ile : イソロイシン残基

Trp : トリプトファン残基

Arg : アルギニン残基

Met : メチオニン残基

また、本明細書中においてDNAのポリマーまたはオリゴマーは下記の如き略号の配列により表記する。

A : 2'-デオキシアデニル酸

C : 2'-デオキシシチジル酸

G : 2'-デオキシグアニル酸

T : チミジル酸

特にことわらない限り、配列の左から右への方向は5'から3'への方向を示すものとする。

インスリンなどのホルモン、アセチルコリンなどの神経伝達物質、リボ蛋白質、免疫グロブリン、細胞増殖因子などは微量で強力かつ特異的に標的細胞のみに作用をおよぼすことが知られている。近年、これらの生理活性物質の標的細胞への作用機構がさかんに研究されるようになってきた。その結果、インスリンなどの一部の生理活性物質については、標的細胞に生理活性物質と特異的に結合する受容体が存在し、生理活性物質との結合により、受容体が生理活性物質の作用を細胞に及ぼすことが解明されるとともに、受容体を構成するタンパクの単離がなされている。これらのこととは、フレイティエット等、バイオケミカル、アンド、バイオフィズイカル、リサーチ、コミュニケーションズ、43巻、400(1971)[Freychet et al, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43, 400(1971)]及びカトレカサス、プロスィ-ディングス、オブ、ザ、ナショナル、アカデミー、オブ、サイエンス、オブ、ナショナル、アカデミー、オブ、アメリカ、68巻、245(1971)(Cuatre-

casas, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 68, 246(1971)などに報告されている。

一方、網内系賦活化作用を有する物質の1種または2種以上を哺乳動物(マウス、ウサギ、モルモット等)に投与し、次いでグラム陰性菌由来のエンドトキシンを注射することによって、または哺乳動物由来の活性化マクロファージを含む組織培養系にグラム陰性菌由来のエンドトキシンを加えることによってL-M細胞に対して細胞障害性を有し、かつメスエイザルコーマで癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壞死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質が説明されることが知られており、後述するように、この生理活性物質の単離、精製及び遺伝子工学的手法での製造が行われるようになってきた。上記の生理活性物質は、正常細胞に対してほとんど障害性を有さず、腫瘍細胞のみを壞死させる性質があることから新しい制癌剤として期待されている。該生理活性物質が微量で癌細胞

のみを特異的に障害することについて、その作用機構の解明については現在に至るまで何らなされていなかった。この理由として、上記生理活性物質の精製が難しく、生理活性物質の作用機構解明に必要な高度に精製されたものがなかったこと、及びクロラミンT法など従来一般に行われている生理活性物質標識方法で放射性同位元素を標識した場合、該生理活性物質が失活してしまうなどの極めて困難な諸問題が挙げられる。

本発明者は、該生理活性物質の癌細胞に対する作用機構について鋭意研究を重ねた結果、該生理活性物質を特異的に認識する受容タンパクが、該生理活性物質に対して感受性の癌細胞にのみ存在し、正常細胞にはほとんど存在しないことを見い出すとともに、該生理活性物質の受容タンパクの単離に成功した。すなわち、本発明者等は、該生理活性物質及び該生理活性物質のモノクローナル抗体を用いた免疫染色法及び該生理活性物質の存在下における³²P-ATP(アデノシン5'-三リン酸)での該生理活性物質に感受性のある癌細胞の処理

により、該生理活性物質に感受性のある細胞の細胞膜に、該生理活性物質と特異的に結合する受容タンパクが存在し、正常細胞にはほとんど存在しないことを見い出した。又、本発明者等は鋭意研究の結果、該生理活性物質の生理活性を維持した状態で放射性同位元素の標識体を得ることに成功し、それを利用して該生理活性物質受容タンパクの諸特性を知見した。更に本発明者等は、該生理活性物質に感受性のある細胞の膜画分を、該生理活性物質を担体に固定させて得られる親和性吸着体を用いるアフィニティーコロマトグラフィーを含む精製処理に付すことにより該生理活性物質の受容タンパクを単離できることを見い出した。本発明は上記の知見に基づきなされたものである。

即ち、本発明によれば、L-M細胞に対して細胞障害性を有しかつメスエイザルコーマ癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壞死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質の受容タンパクが提供される。更に本発明によれば、L-M細胞に対して細胞障害性

を有しかつメスエイザルコーマ癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壞死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質に感受性のある細胞より単離された該生理活性物質の受容タンパクが提供される。更にまた本発明によれば、L-M細胞に対して細胞障害性を有しかつメスエイザルコーマ癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壞死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質に感受性のある細胞の膜画分を、該生理活性物質を担体に固定させて得られる親和性吸着体を用いるアフィニティーコロマトグラフィーに付することを含む精製処理にかけることを特徴とする該生理活性物質の受容タンパクの単離方法が提供される。

本発明でいう生理活性物質は、L-M細胞に対して細胞障害性を有し、メスエイザルコーマ癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合、腫瘍部位に出血性の壞死反応を起こせる性質を有する。また、この生理活性物質は、*in vitro*で

正常細胞にはほとんど有害な作用をおよぼさないという特徴をもつ。このような性質を有する生理活性物質としては、種々の高等動物由来のものが知られており、これらは腫瘍壞死因子(以下TNFと称す)と命名された。種々のTNFうち、特にウサギ由来及びヒト由来のものについてはその構造も明らかにされ、組換DNA技術による大量生産技術が確立されている。

次にまず、ウサギTNFについて説明する。ウサギTNFは少なくとも下記のアミノ酸配列を有するものである。

Ser Ala Ser Arg Ala Leu Ser Asp Lys Pro
Leu Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Val
Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Ser Gln Arg
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Lys
Leu Thr Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ala
Asp Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val
Leu Phe Ser Gly Gln Gly Cys Arg Ser Tyr
Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser Arg Phe
Ala Val Ser Tyr Pro Asn Lys Val Asn Leu

Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys His Arg
Glu Thr Pro Glu Glu Ala Glu Pro Met Ala
Irp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val
Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser
Thr Glu Val Asn Gln Pro Glu Tyr Leu Asp
Leu Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly
Ile Ile Ala Leu

上記アミノ酸配列を有するウサギTNFは、ウサギ成熟TNFとも称される。

又、前記アミノ酸配列を有するウサギTNFのN-末端にメチオニン残基がペプチド結合しているものも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

更に又、ATGAGCACTGAGAGTATGATCCGGGACGTCGAGC
TGGCGGAGGGGCCGCTCCCCAAGAAGGCAGGGGGGCCCCAGGGC
TCCAAGCGTTGCCCTCTGCCCTCAGCCCTCTCTCTCTCTGCTCGT
GGCTGGAGCCACCACGCTCTCTGCCCTGCTGCACCTCAGGGTGA
TCGGCCCTCAGGAGGAAGAGCAGTCCCCAAACAACCTCCATCTA
GTCAACCCCTGTGGCCAGATGGTCACCCCTCAGAの塩基配列
で示されるDNAから導かれるアミノ酸配列で示さ
れるペプチドのC-末端を含む一部または全部のペ

プチドが前記ウサギ成熟TNFのN-末端側に結合しているものも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

前記したウサギTNFは次の如き塩基配列を有するDNAを用いて組換DNA技術により得ることができる。

TCA GCT TCT CGG GCC CTG AGT GAC AAG CCT
CTA GCC CAC GTA GTA GCA AAC CCG CAA GTG
GAG GGC CAG CTC CAG TGG CTG AGC CAG CGT
GCG AAC GCC CTG CTG GCC AAC GGC ATG AAG
CTC ACG GAC AAC CAG CTG GTG GTG CCG GCC
GAC GGG CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTT
CTC TTC AGC GGT CAA GGC TGC CGC TCC TAC
GTG CTC CTC ACT CAC ACT GTC AGC CGC TTC
GCC GTC TCC TAC CCG AAC AAG GTC AAC CTC
CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAC CGG
GAG ACC CCC GAG GAG GCT GAG CCC ATG GCC
TGG TAC GAG CCC ATC TAC CTG GGC GGC GTC
TTC CAG TTG GAG AAG GGT GAC CGG CTC AGC
ACC GAG GTC AAC CAG CCT GAG TAC CTG GAC

CTT GCC GAG TCC GGG CAG GTC TAC TTT GGG
ATC ATT GCC CTG

ウサギTNFを成熟形で組換DNA技術により微生物もしくは細胞の培養により產生せしめるためには、上記塩基配列の5'端にATGを付加した構造を有するDNAを含む遺伝子組換体を用いることができる。

更に又、ATGAGCACTGAGAGTATGATCCGGGACGTCGAGC
TGGCGGAGGGGCCGCTCCCCAAGAAGGCAGGGGGGCCCCAGGGC
TCCAAGCGTTGCCCTCTGCCCTCAGCCCTCTCTCTCTGCTCGT
GGCTGGAGCCACCACGCTCTCTGCCCTGCTGCACCTCAGGGTGA
TCGGCCCTCAGGAGGAAGAGCAGTCCCCAAACAACCTCCATCTA
GTCAACCCCTGTGGCCAGATGGTCACCCCTCAGAの塩基配列
で示されるDNAの3' - 末端を含む一部または全部のDNAがウサギTNFをコードする前記塩基配列の
5' - 末端側に結合しているDNAを含む遺伝子組換体を用いて得られるポリペプチドも本発明でいう
生理活性物質に含まれる。

更に又、自然の変異によりまたは人工的変異により、主たる活性に変化を与えることなく、蛋白質の構造の一部を変異せしめることが可能であり、

前記したすべてのウサギ由来のポリペプチドまたはその誘導体ペプチドの相同変異に相当する構造を有するポリペプチドをも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

上記ウサギTNFは、例えば特願昭59-19850号明細書に記載されている方法で製造することができる。その概略は次の通りである。

(以下余白)

1. ウサギを網内系試活化作用を有する物質により刺激する。

2. 前記ウサギを5~15日間飼育した後、グラム陰性菌のエンドトキシンで処理し、その血清を取得する。この血清はL細胞障害活性及び抗腫瘍活性を示す(この活性を示す物質を血清TNFと称する)。

3. 網内系試活化作用を有する物質により刺激されたウサギを5~15日間飼育した後、気管切開により肺胞洗浄細胞を得る。

4. 肺胞洗浄細胞を、グラム陰性菌より得たエンドトキシンと共に培養する。

5. 前記細胞培養の上清中にL細胞障害活性が認められる。この活性は、血清TNFをマウスに処理して得られる抗血清(以下抗TNF抗体と称する)により消去される。エンドトキシンを共存させない細胞培養上清中にはL細胞障害活性は認められない。

6. 前記細胞培養中に放射性メチオニンを共存させて得られる上清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析することにより、分子量17500±2000の蛋白の生成が認められる。エンドトキシンを共存させない細胞培養上清にはこの蛋白の生成は、認められない。

7. 前記細胞培養の上清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画すると分子量17500±2000の位置にL細胞障害活性が認められる。血清TNFのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析もこれに一致する。

8. 前記細胞培養から細胞を集め、リボヌクレアーゼ阻害剤の存在下に、細胞質リボヌクレイン酸(以下、RNAと略す)を抽出する。

9. 細胞質RNAから、オリゴdTカラムに対する吸着性画分(以下mRNA(メッセンジャーRNA)と略す)を得る。

10. 上記mRNAをショ糖密度勾配遠心により分画する。

11. 上記分画をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、培養し、培地および卵母細胞中にL細胞障害活性を示す分画を集める。

12. 上記アフリカツメガエル卵母細胞中に生成するL細胞障害活性は、抗TNF抗体により消去される。

13. 分画されたmRNAを、これに相補的な一重鎖DNAに転換し、これから更に二重鎖DNAを調整する。この3'-末端にデオキシシチジル酸のオリゴマーを付加せしめ、1つ又は複数の表現型マークーを有するプラスミドのようなベクターの中に挿入する。

14. このように調製されたベクターを使用して大腸菌細胞を形質転換して、mRNAに相補的なDNAを含有する大腸菌12000株を得る。

15. 血清TNFを精製し、そのアミノ酸配列を定める。

16. 血清TNFのアミノ酸配列に基づきオリゴヌクレオチドを合成し、これを放射線標識する。

17. 14で調製したDNAを移しとったロ紙と、16で得た放射線標識されたDNAをハイブリダイズさせ、X線フィルムを強く感光させる株9個を選択する。

18. 17で選択された9個の菌株からプラスミドを単離し、制限酵素で切断し、共通の大きさの断片を有するプラスミドを有する菌株を得る。このうち2株はL細胞障害活性を有する物質を生産することが判明する。

19. この菌株からプラスミドを単離し、塩基配列を決定する。この塩基配列から演繹されるアミノ酸配列の1つは、16で得られたTNFのアミノ酸配列と一致する。

20. TNFのアミノ酸配列を与えるDNA配列を発現ベヒクルの下流に接続し、この発現ベヒクルを適当な宿主細胞を形質転換するために用い、この宿主細胞を培地中で増殖させ、所望のTNFを発現させる。

21. ここに得られたTNF活性は、抗TNF抗体により消去される。

上述の方法においてはウサギTNFの遺伝情報を直接的に示しているmRNAを含有する細胞質RNAは、上記の如くエンドトキシン処理された肺胞洗浄細胞から取得されるが、ウサギの他の細胞例えば末

またはブレプロペプチド)で産生され成熟過程(プロセシング)により中間体を経由して成熟TNFとなることが推定される。ウサギTNFのこのような未成熟形態は、TNF遺伝子の塩基配列から推定することができる。未成熟形態及び中間体のウサギTNFをコードする遺伝子もまた、天然のまたは人工的DNAを用いて組換を行うことができる。DNAの組換に際してはウサギTNFをコードする遺伝子を正しく転写、翻訳が行なわれるような配列において、プロモーター等の5'領域の遺伝子配列に接続し、細菌または高等生物細胞中で複製可能なベクターと接続した組換遺伝子をこの組換遺伝子によって細菌または高等生物細胞を形質転換し、この形質転換体を増殖せしめ、TNF遺伝子を発現せしめることによりTNFを得ることができる。

上記のウサギ由来のTNF又はそれから誘導される種々のポリペプチドを組換DNA技術により產生する一つの形態は、メチオニンコドン(ATG)を成熟あるいは未成熟あるいは中間体TNF遺伝子の5' - 末端に導入することである。このようにす

る血中のプラスチック吸着性細胞、また末梢血や肝臓、脾臓等のエンドトキシン感受性細胞をエンドトキシン処理することにより得ることができる。

mRNAはまた、染色体DNAを適当なベクターに接続して動物細胞に導入することにより得ることができる。このような系として、SV40をベクターとし、COS細胞をホストとする組換による方法がよく知られている。(これらのこととは例えばマンティ等(Mantel et al), ネイチャー(Nature), 281巻, 40(1979)及びメロン等(Mellon et al), セル(Cell), 27巻, 279(1981)など)に報告されている。

かくして得られたmRNAをcDNAに変換し、プローブを用いるハイブリダイゼーションによって選択されたDNAは、種々の目的に応じて組換えられる。

各アミノ酸に対応するコドン(遺伝暗号)の使用頻度が異なる等の理由により、アミノ酸配列を変えることなく、塩基配列の一部または全部を、有機化学的に合成された人工のDNAに置き換えることも可能である。

ウサギTNFはまた、細胞内で未成熟形態(ブレ

ることにより、適当なプロモータによって合成されるmRNAから成熟あるいは未成熟あるいは中間体TNFが産生される。この様にN末端に付加されたメチオニン残基は宿主によっては自然に除去される。

また別の形態によれば、シグナル配列と呼ばれる疎水性に富んだ配列を付加することにより、宿主細胞の外またはグラム陰性細菌においては、ペリプラズムと呼ばれる部分へ、分泌させることも可能である。

また、開始コドンを組み込んであるベクターの場合は、ベクターから由来するペプチドとTNFとの融合ペプチドを形成するが、この場合は化学的または酵素的に切断するか、もしくはTNFの主たる活性に変化がなければ、そのまま用いることができる。

上記で述べた遺伝子工学的手法によるウサギTNFの製造で用いられる具体的な宿主、ベクター及びプロモーターとしては、後述する遺伝子工学的手法によるヒトTNFの製造において用いられるものを利用することができる。

次にヒトTNFについて説明する。ヒトTNFは少なくとも下記のアミノ酸配列を有するものである。

(以下余白)

Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val
Ala His Val Val Ala Asp Pro Gln Ala Glu Gly
Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala
Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn
Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu
Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr
Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys
Val Asn Leu Leu Ser Ala Lys Ser Pro Cys
Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
Pro Itp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val
Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala
Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala
Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
Leu

上記アミノ酸配列を有するヒトTNFはヒト成熟TNFとも称される。

前記アミノ酸配列を有するヒトTNFのN-末端にメチオニン残基がペプチド結合しているものも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

前記したヒトTNFは次の如き塩基配列を有するDNAを用いて組換DNA技術により得ることができる。

TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTC
GCC CAT GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG
CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC CGG GCC AAT GCC
CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC
CAG CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC
ATC TAC TCC CAG GTC CTC TTC AAG GGC CAA GGC
TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC
ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG
GTC AAC CTC CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC
CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC AAG
CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC
TTC CAG CTG GAG AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT
GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC TTT GCC
GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC
CTG

ヒトTNFを成熟形で組換DNA技術により微生物もしくは細胞の培養により産生せしめるため

には、上記塩基配列の5'端にATGを付加した構造を有するDNAを含む遺伝子組換体を用いることができる。

更に又、自然の変異によりまたは人工的変異により、主たる活性に変化を与えることなく、蛋白質の構造の一部を変異せしめることが可能であり、前記したすべてのヒト由来のポリペプチドまたはその誘導体ペプチドの相同変異に相当する構造を有するポリペプチドをも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

更に又、前記ヒト成熟TNFのN-末端のアミノ酸を4個削除した形のポリペプチドも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

上記ヒトTNFは以下のように作製するものである。すなわち、ウサギのTNFのアミノ酸配列構造をもとにヒト染色体遺伝子より、通常の遺伝子組換操作の手法を使って取り出したDNAを用いて、人工的に新規のDNAを構築し、該DNAを組み込んで目的の遺伝子組換体を作製する。この製法の詳細は、特願昭59-115496号および特願昭5

9-115497号明細書に記載してある。その概略は次の通りである。

1. バクテリオファージス/ウサギ染色体遺伝子ライブラリーとバクテリオファージス/ヒト染色体遺伝子ライブラリーは、ハーバード大学生化學および分子生物學部(ディヴィニティアベニュー、マサチューセッツ02138、アメリカ(7 Divinity Avenue, Cambridge, Massachusetts 02138, U.S.A.))のティ・マニアティス(T. Maniatis)教授により調製されたものを用いる。これらのライブラリーは次の方法によって作ることができる。

[セル(Cell), 15, 687 (1978) 参照]

(1) ウサギあるいはヒトの組織、たとえばウサギあるいはヒトのすい臓を凍結粉末にし、RNAの蛋白成分を分解処理し、沈澱によってウサギあるいはヒトの高分子DNAを得る。

(2) この高分子DNAは遺伝子座位をランダムに切るために、部分的に分解する。

(3) 得られたDNA断片から分子量分面によって、15から20キロ塩基対(Kb)の大きさ

の断片を得る。

(4) 工程3で得られたDNA断片をE. coli 4 A ファージベクターを用いてクローニングする。

(5) 得られたベクターを、rDNAを含む感染性のファージ粒子に *in vitro* で組み入れ、上記のウサギあるいはヒトの染色体遺伝子ライブラリーを得る。

2. 後述の参考例2で得られたウサギTNFのcDNAは、ピー・ダブリュ・ジェイ・リグビー(P. V.J. Rigby)らのニックトランスレーション法(ジェイ・モル・バイオル, 113, 237 (1977) (J. Mol. Biol. 113, 237 (1977)))によって、³²Pでラベル化する。

3. バクテリオファージス/ウサギ染色体遺伝子ライブラリーとバクテリオファージス/ヒト染色体遺伝子ライブラリーのそれぞれを、バクテリアの均一層の上に密にブラークができるように植えつけ、³²PでラベルしたウサギTNFのcDNAとハイブリダイズさせてスクリーニングする。

4. 適合するクローニングより、対応するDNAを単離し、制限酵素地図を作り、ザーンハイブリダイズ法(イー・エム・ザーン、ジェイ・モル・バイオル, 98, 503 (1957)) [E. M. Southern, J. Mol. Biol., 98, 503 (1975)]によって解析する。

制限酵素により分解されたウサギTNFとヒトTNFの遺伝子を含む断片を、プラスミドベクター中に導入し、サブクローニングした後、塩基配列を解析する。

5. ウサギTNFのcDNAとウサギTNF遺伝子の塩基配列を比較して、ウサギTNF遺伝子のエクソン(ウサギTNFのアミノ酸配列をコードする塩基配列)と、イントロン(ウサギTNFのアミノ酸配列をコードしない塩基配列)を決定する。

6. そして、ウサギTNF遺伝子とヒトTNFの遺伝子を比較して、ヒトTNF遺伝子のエクソンとイントロンを決定する。

7. ウサギTNF遺伝子のイントロンを削除し

エクソンを結合することによって得られた塩基配列より決められるウサギTNFのアミノ酸配列は、ウサギTNFのcDNAの塩基配列より決められるアミノ酸配列と一致することが確認される。

8. 次に、ヒトTNF遺伝子のイントロンを削除し、エクソンを結合することによって得られた塩基配列よりヒトTNFのアミノ酸配列が決められる。ヒトTNFのアミノ酸配列は、ウサギTNFのアミノ酸配列と部分的に一致することが確認される。

9. その後、ヒトTNFをコードするDNAを *in vitro* で修飾し、適当な発現ベクターに導入し、そのDNAを含む組換DNAを作製する。組換DNAは適当な宿主に導入し、これを培養液中で増殖せしめて所望のヒトTNFを発現せしめる。

10. このようにして得られるヒトTNFは成熟形でセリンから始まる155個のアミノ酸残基からなる。それがプレシーケンスにシグナルペプチドを有している場合、シグナルペプチドは非常に

疎水性の性質を有する。

以上は、ヒトTNF遺伝子およびヒトTNFをコードするDNAの取得方法および該DNAを用いるヒトTNFの製造方法を示したものである。

上記において得られるヒトTNFをコードするDNAについては各アミノ酸に対応するコドン(遺伝暗号)の使用頻度が異なる等の理由により、アミノ酸配列を変えることなく、ヒトTNFをコードするDNAの塩基配列の一部または全部を、有機化学的に合成された人工のDNAに置換えることも可能である。

おそらく、ヒトTNFは、プレペプチド又はブレプロペプチドとして未成熟形で細胞内に產生され、プロセシング段階でプロセスされて中間体を経て、成熟TNFを形成するものと考えられる。ヒトTNFの未成熟形はヒトTNF遺伝子の塩基配列から演繹される。未成熟又は中間体のTNFをコードするDNAからなるTNF-DNAは、また天然又は人工合成のDNAと組換えることができる。

成熟あるいは未成熟あるいは中間体TNFが產生される。この様にヒトTNFの末端に付加されたメチオニン残基は、宿主によっては自然に除去される。終止コドンを挿入する目的はヒトTNF-DNAから転写されたmRNAからの翻訳を適当な位置(ヒト由来のポリペプチドまたはその誘導体ペプチドのC末端)で止める事である。

また別の形態によれば、“シグナル配列”と呼ばれる疎水性に富んだ配列を付加することにより、宿主細胞の外またはグラム陰性細菌においては、“ペリプラズム”と呼ばれる部分へ分泌させることも可能である。

また、開始コドンを組込んであるベクターの場合は、ベクターから由来するペプチドとTNFとの融合ペプチドを形成するが、この場合は化学的または酵素的に切断するか、もしくはTNFの主たる活性に変化がなければ、そのまま用いることができる。

上記で述べた遺伝子工学的手法によるヒトTNFの製造で用いられる具体的な宿主、ベクター及

DNAの組換に際してはヒトTNFをコードする遺伝子を、正しく転写し、それによって得られるmRNAからの翻訳が正しく行われるような配列において、プロモーター等の5'領域の遺伝子配列に接続し、得られたヒトTNF-DNA-プロモーター配列を細菌または高等生物細胞中で複製可能なベクターと接続した組換遺伝子を得、この組換遺伝子によって宿主として細菌または高等生物細胞を形質転換し、この形質転換体を増殖せしめ、ヒトTNF遺伝子を発現せしめることによりヒトTNFを得ることができる。

上記のヒト由来のTNF又はそれから誘導される種々のポリペプチドを組換DNA技術により產生する一つの形態は、メチオニンコドン(ATG)を成熟あるいは未成熟あるいは中間体TNF遺伝子の5'端に導入し、そして3'端にTAAもしくはTAGもしくはTGAの終止コドンと呼ばれるトリプレットを、少なくとも1箇導入することである。メチオニンコドンが存在することにより、適当なプロモーターによって合成されるmRNAか

びプロモーターについて以下に記載する。

宿主として大腸菌〔エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)〕(以下“大腸菌”と記載する)を用いる場合は好適には大腸菌K12株の種々の変異株、例えばHB101(ATCC33694)、C600K(ATCC33955)、D1210、RR1(ATCC31343)、MC1061、LE392(ATCC33572)、JM101(ATCC33876)、z1776(ATCC31244)などが用いられる。

大腸菌を宿主とする場合のベクターとしては、pBR322、pBR325、pBR327、pUC8、pUC9(ATCC37019)、pJB8(ATCC37074)、pKC7(ATCC37084)等のプラスミドあるいはλgt、λB、シャロン4Aのようなスフージ、M13フージなどが用いられる。

大腸菌の菌体中に、該生理活性ポリペプチドを產生させるために、大腸菌の遺伝子またはフージ遺伝子のプロモーターが使用される。このようなプロモーターとして、好適にはラクトース分解酵素(LAC)のプロモーター及びそのUV5変

具、ペニシリナーゼ (B L A) 、トリプトファン合成酵素 (T R P) のプロモーター、スファージのP_Lプロモーターあるいはトリプトファン合成酵素と、ラクトース分解酵素の融合プロモーターであるtacプロモーター等が用いられる。

枯草菌 (Bacillus subtilis) (以下“枯草菌”と記載する) を宿主とする場合には、BD170株 (ATCC 33608) 、BR151株 (ATCC 33677) 、MI112株 (ATCC33712) などが用いられ、ベクターとしてはpC194 (ATCC37034) 、pUB110 (ATCC 37015) 、pSA2100 (ATCC37014) 、pE194などのプラスミドが用いられる。

枯草菌を宿主とする場合のプロモーターとしては、クロラムフェニコールアセチル化酵素 (CAT) やペニシリナーゼ、エリスロマイシン耐性等の遺伝子のプロモーターが用いられる。

酵母を宿主とする場合は、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) のRH218株 (ATCC 44076) 、SHY 1株 (ATCC 44769) 。

SHY 3株 (ATCC 44771) 、D131A株、483株、830株などが用いられ、そのベクターとしてはYEp13 (ATCC 37115) 、YEp6、YRp7、YIp5等のプラスミドが用いられる。

酵母を宿主とする場合、プロモーターとしては疎性ホスファターゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH1) 、トリプトファン合成酵素 (T R P) 、ホスホグリセレートキナーゼ (PGK) 、デトクロームB (COB) 、アクテン等の遺伝子のプロモーターが用いられる。

以上のようにして作製した遺伝子組換体で形質転換した微生物を通常の方法で大量に培養した後、目的とする該生理活性物質を産生させる。次いで該生理活性物質を含む微生物菌体の培養上清もしくは、菌体破碎抽出液を原液として、通常の生化学的分離精製方法を組み合せて精製する。精製方法として、たとえば、硫酸アンモニウムによる塩析法、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過法、電気泳動法、アフィニティーコロマトグラフィーなどがあげられる。

1×10⁻⁸~1×10⁻¹

本発明でいう生理活性物質は、上記で述べたウサギあるいはヒト遺伝子組換体より生産されるTNF以外に、従来の方法で、網内系賦活化作用を有する物質を1種または2種以上、ウサギに投与し、次いでグラム陰性菌由来のエンドトキシンを注射することによって、またはウサギ又はヒト由来のマクロファージを含む組織培養系にグラム陰性菌由来のエンドトキシンを加えることによって誘発されて得たウサギ又はヒトのTNF組換え液を陰イオン交換体クロマトグラフィー、ゲルろ過アフィニティーコロマトグラフィー、電気泳動的等電点分画法などの通常の生化学的分離精製方法を組合せて精製したウサギあるいはヒトTNFを包含する。

本発明における生理活性物質の受容タンパクは下記の特性を有する。

a)分子量 85,000±10,000 (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法)

b)生理活性物質との結合における解離定数

本発明における生理活性物質受容タンパクは、該生理活性物質に感受性を示す細胞から単離することができる。該生理活性物質感受性細胞としては、魚類、両生類、農虫類、鳥類、哺乳類などの脊椎動物由来の感受性細胞が挙げられる。その中で、ヒト、マウス等の哺乳動物由来の感受性細胞が好ましく、例えば、ヒトの筋肉由来の株化細胞MJ-841 (NCACC 85081801) 、ヒト単球性白血病由来の株化細胞THP-1 (IFO 50054) 、ヒト鼻咽癌由来の株化細胞KB (ATCC CCL17) 、ヒト乳癌由来の株化細胞BT-20 (ATCC ATB18) 及びMCF-7 (ATCC HTB22) 、ヒト子宮癌由来の株化細胞ME-180 (ATCC ATB33) 及びマウスの線維芽肉腫由来の株化細胞L-M (ATCC CCL1.2) が挙げられる。更にこれらの細胞の変異株や細胞より单細胞クローニングしたサブライン (Subline) が挙げられるがこれに限定されるものではない。又、外科的手

術により摘出された癌組織もまた本発明の受容タンパク取得のための原料として用いることができる。

上記の細胞の中で株化細胞は、通常は牛胎児血清を含有する人工栄養培地で組織培養されるが、血清を含まない無血清人工栄養培地中に於ても組織培養することが可能であり、更にヌードマウスや幼若ハムスターの腹腔内、皮下に於ても十分増殖が可能である。例えば、ヒトの筋肉種由來の株化細胞である上記M J - 841は、20% F B S (牛胎児血清)、25 μg/mlのタイロシンを含有する人工栄養培地であるD M I 60 A U 培地(日本製薬製)で培養できる。

本発明における生理活性物質受容タンパクは、生理活性物質に感受性のある細胞の膜画分を、該生理活性物質を粗体に固定させて得られる親和性吸着体を用いるアフィニティーコロマトグラフィーを含む精製処理に付すことにより単離することができる。精製処理にはアフィニティーコロマトグラフィーの他にイオン交換、ゲル汎過、電気泳

動などを連続組合せることができる。その具体的方法としては、例えば次の方法を挙げることができる。

(以下余白)

1. 生理活性物質感受性細胞を細胞洗浄液(例えば、ホウ酸、塩化ナトリウム、塩化マグネシウムおよび塩化カルシウム含有水溶液)で洗浄する。その後、抽出液(例えば、ホウ酸及びEDTA(ニチレンジアミン四酢酸塩)含有溶液)に懸濁後、凍結と融解をくり返し、さらに超音波処理で細胞を破壊する。

2. ガーゼ汎過等及び低速遠心分離により細胞塊を除去する。

3. 高速遠心分離で細胞質画分を除去する。

4. ショ糖密度勾配遠心分離で膜画分を得た後、超高速遠心によりペレット状で膜画分を回収する。

5. 上記で得られる膜画分をユーオクチル-β-ドーグリコシド等の透析容易な界面活性剤含有緩衝液に溶解したものをゲル汎過に付す。溶離液としては0.15M NaClを含む界面活性剤含有緩衝液が用いられ、そのpHは通常6.0~8.0である。ゲル汎通用粗体の具体例としては、セファデックスG-150、セファデックスG-200、セファクリルS-200(以上ファルマシア社製)

、バイオゲルP-150、バイオゲルP-200(バイオラッド社製)、トヨバールHW-55、トヨバールHW-65(以上東洋ソーダ株式会社製)等が挙げられる。

6. 上記で得られる溶出画分をホローファイバーメモリ(平膜等で5~100倍程度に濃縮する)。

7. 後述の参考例7のようにして作製した生理活性物質を粗体に固定してなるアフィニティーカラムに上記1~6の工程を経て得られた溶出液を供給後、界面活性剤含有緩衝液で洗浄する。その後、該生理活性物質含有緩衝液で溶出する。用いられる粗体の具体例としては、セファロース4B、セファロース6B、セファロースCL-4B、セファロースCL-6B(以上ファルマシア社製)、バイオゲルA-5m、バイオゲルA-15m、アフィゲル(以上バイオラッド社製)などのアガロース系粗体セファデックスG-100、セファデックスG-150、セファデックスG-200(以上ファルマシア社製)などのデキストラン系

抗体、バイオゲルP-300、バイオゲルP-200（以上バイオラッド社製）などのポリアクリルアミド系抗体、セルロファインGC-200、セルロファインGC-700（以上生化学工業社製）などのセルロース系抗体が挙げられる。

8. 上記で得られる溶出液をゲル汎過に付す。溶離液としては3M NaClを含む界面活性剤含有緩衝液が用いられ、そのpHは通常6.0～9.0である。ゲル汎通用抗体の具体例としては、セファデックスG-150、セファデックスG-200、セファクリルS-200（以上ファルマシア社製）、バイオゲルP-150、バイオゲルP-200（バイオラッド社製）、トヨパールHW-55、トヨパールHW-65（以上東洋ソーダ株式会社社製）等が挙げられる。

9. 得られる溶出液を後述の実施例で示す方法において濃縮及び脱塩を行い、単離受容タンパクを得る。

本発明の生理活性物質受容タンパクは、広範な種類の癌細胞に共通した新しい癌特異抗原として

の性質を有するものであり、該受容タンパクを特異的に認識する抗体を用いた新しい癌の診断治療法の開発のための抗体取得用抗原として応用できるものである。また、上記の単離精製された生理活性物質受容タンパク以外に、生理活性物質受容タンパクを含有する生理活性物質感受性細胞及び該感受性細胞の膜固分、あるいは遺伝子工学的手法を用いて製造された受容タンパク又はその抗原決定基なども抗体取得用抗原として用いることができる。本発明の受容タンパクに対する抗体としては、上記抗原を山羊、羊、ウサギ、モルモット、ラットおよびマウス等の動物に、プロイントの完全アジュバントなどとともに投与することにより得られる抗血清ならびにハイブリドーマを用いる従来の取得法により得られるモノクローナル抗体を挙げることができる。

又、本発明の受容タンパクに対する抗体としては、上記の方法で得られるものの他に、本発明の受容タンパクを特異的に認識する、TNFに対する活性消去型のモノクローナル抗体に対する抗イ

デオタイプ抗体も挙げられる。この抗イデオタイプ抗体は、TNFの活性を消去する活性消去型のモノクローナル抗体を抗原として山羊、羊、ウサギ、モルモット、ラットおよびマウス等の動物に投与して抗血清を得、得られた抗血清をTNFの活性を消去しない活性非消去型の抗体で処理をして抗イデオタイプ抗体以外の抗体を吸収除去することにより得ることができる。得られた抗体を放射性同位元素で標識して、体内に投与し癌の診断に用いることができる。又、抗体に制癌剤を結合させてミサイル療法にも用いることも可能である。又、抗体そのものを、癌細胞を特異的に認識し破壊する制癌剤として癌の治療に用いることができる。更に又、血液中の癌細胞に特異的な抗原の検出に用いて癌の診断及び制癌剤の治療効果のモニタリングのために用いることもできる。更にまた、本発明の生理活性物質の受容タンパクは、MDP（ムラミルジペプチド）などの免疫増強物質で混和して用いることにより、特異的に受容タンパクに対する免疫能を誘発させる癌ワクチンの材料と

しても有用である。

（以下余白）

以下に参考例および実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

なお、参考例において、粗換DNAの作製、粗換体の微生物への導入は、特に断らない限り下記の実験書(1)～(4)に従って実施する。

- (1) 高木康敬編著 『遺伝子操作マニュアル』、講談社
- (2) 高木康敬編著 『遺伝子操作実験法』、講談社
- (3) ティー・マニアティス(T. Maniatis), イー・エフ・フリッヂュ(E. F. Fritsch), ジェイ・サンブルック(J. Sambrook), モレキュラークローニング(Molecular Cloning), コールドスプリングハーバー ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)刊(1982年米国)
- (4) レイ・ウー(Ray Wu)ら、メソッド イン エンザイモロジー(Method in Enzymology) 101巻 アカデミック プレス(Academic Press) (米国)刊

参考例および実施例中で用いられる略号

HOPS	: モリフォリノプロパンスルホン酸
LB培地	: ルリアーベルタニ培地
DMSO	: ジメチルスルフォキシド
PFU	: プラーク・フォーミング単位
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
BRL	: ベセスダ・リサーチ・ラボラトリー社、米国
DHF	: ジメチルホルムアミド
Lac	: ラクトース
Tris	: トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン
XAR-5	: X線フィルム(イーストマン・コダック社、米国)
1×SSC	: 0.15M 塩化ナトリウム + 0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7
2×SSC	: 0.30M 塩化ナトリウム + 0.030M クエン酸ナトリウム、pH 7
3×SSC	: 0.45M 塩化ナトリウム + 0.045M

クエン酸ナトリウム、pH 7

5×SSC : 0.75M 塩化ナトリウム + 0.075M
クエン酸ナトリウム、pH 7

6×SSC : 0.90M 塩化ナトリウム + 0.090M
クエン酸ナトリウム、pH 7

FDSS : 5% 脱イオン化フォルムアミド +
5×Denhardt's + 5×SSPE + 0.1% SDS

+ 100 μg/ml 变性ウシ胸腺DNA

SSPE : 0.18M 塩化ナトリウム + 10 mM リン酸二水素ナトリウム + 1 mM EDTA, pH 7.4

SM : 1 l 中に塩化ナトリウム 5.8g、硫酸マグネシウム・7水和物 2g、1M

Tris・Cl (pH 7.5) 50mM と 2% ゼラチン 5mM を含むファージ保存培地

NZプロス : 1 l 中にNZアミン(カゼインのタイプA 水解物、フムコ・シエフィールド・ケミカル・ディビジョン・オブ・クラフト社、米国) 10g、塩化ナトリウム

ム 5g と硫酸マグネシウム・7水和物 2g を含む培地

IPTG : イソプロピルチオガラクトシド

X-gal : 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルガラクトシド

TAE : 0.04M Tris-酢酸(pH 8.0) - 0.002M EDTA

5×デンハルト溶液 : 1 l 中にフィコール(Ficoll)

10000mg、ポリビニルピロリドン

10000mg、及びウシ血清アルブミン

10000mg を含む水溶液

bp : 基準対

参考例 1 L細胞障害活性評価

以下の参考例2及び3においてL細胞を用いる活性評価は、Ruff等(Lymphokines 2巻 E. Pick 編集、Academic Press 235頁(1980)]あるいは[J. Immunol. 126巻 1279頁(1981年)]の方法に準じ、本発明において用いられる生理活性物質がL929細胞(ATCC

CCL1) を殺す効果を測定するものである。すなわち、順次培地で希釈した試料 0.1 ml と、 10^4 個/ ml の濃度の L 細胞の培地懸濁液 0.1 ml を、96穴の組織培養用マイクロプレート（フロー・ラボラトリー社、米国）に加える。培地は 1v/v\% のウシ胎児血清及び最終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアクチノマイシンDを含むイーグルのミニマム・エッセンシャル培地（その組成は、たとえば、「組織培養」中井準之助他編集、朝倉書店、1967年に記載されている）を用いる。マイクロプレートを 5% の炭酸ガスを含む空気中、37°Cで 21 時間培養する。培養終了後、20% グルタルアルデヒド水溶液 $20 \mu\text{l}$ を加え、細胞を固定する。固定後、マイクロプレートを洗浄、乾燥して、0.05% メチレンブルー溶液を 0.1 ml 加え、生き残った細胞を染色する。余分なメチレンブルーを洗い流し乾燥した後、残ったメチレンブルーを 0.36 N 塩酸溶液で抽出し、その 665 nm における吸光度をタイターテック・マルチスキャン（フロー・ラボラトリー社、米国）で測定

用いる色素結合法から算出する。

参考例 2

工程 1 (ウサギ血清 TNF の取得)

雄ウサギ（体重 $2.5 \sim 3.0 \text{ kg}$ ）にホルマリンにて死菌処理したプロピオニバクテリウム・アクネス (*Propionibacterium acnes*) [コリネバクテリウム・パーバム (*Corynebacterium parvum*)、ウエルカム社、英国] 50 mg を耳静脈より注射する。該ウサギに 8 日後再度 $100 \mu\text{g}$ のエンドトキシン [大腸菌 O26 : B6 由来のリポポリサッカライド、ディフコ社製、米国] を耳静脈より注射し、2 時間後に心臓より全採血する。採取した血液に 100 ml 当り 100 単位のヘパリンナトリウムを加えた後、 $5,000 \text{ rpm}$ で 30 分間冷却遠心操作を行ない、血球および不溶固形物を除去する。40羽のウサギより、血清 $\text{TNF} 3 \times 10^6$ 単位/ ml の活性を有する血漿 2.4 ml が得られる。

工程 2 (血清 TNF の部分精製)

工程 1 で得た血漿 2.4 ml にセライト 24 g を加え、1 時間振搗した後过滤する。过滤液に 1.2 ml

する。この吸光度は、生き残った細胞数に比例する。L929細胞の 50% を殺すために必要な生理活性量を 1 単位/ ml と定義し、試料を加えない对照の吸光度の 50% の値に相当する試料の希釈率を、グラフあるいは計算によって求め、その希釈率の逆数を試料の生理活性量（単位/ ml で表記する）とする。参考例において用いる“1 単位”は、 10^4 個/ ml の L929細胞の 50% を殺すウサギ TNF の量を意味する。

なお、参考例 4～6 における L 細胞障害活性の測定法は、上記の方法と次の点で異なる。すなわち L929細胞のかわりに L-M 細胞を用いること、培地に 10v/v\% のウシ胎児血清を含むイーグルのミニマム・エッセンシャル培地を用いること、培地時間を 21 時間のかわりに 48 時間とすることが異なる。

一方、蛋白質量は、ブラッドフォード (Bradford) らの方法 [Anal. Biochem. 72 卷 248～254 頁 (1976 年)] により、クーマシー・ブリリアント・ブルー G 250 を

の 0.04 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8) を加えた後、 0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.04 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8) で充分に平衡化した DEAE セファロース CL-6B (ファルマシア社、スウェーデン) のカラムに添加する。 0.04 M トリス-塩酸緩衝液で洗浄後、 0.18 M 塩化ナトリウムを含む 0.04 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) を用いて溶出する。L 細胞障害活性を示す画分を、限外通過により濃縮する。次いで 5 mM リン酸緩衝液で平衡化したセファクリル S-200 (ファルマシア社、スウェーデン) のカラムに該濃縮液を添加し、同緩衝液にてゲル通過を行う。活性画分は限外通過により濃縮し 3.5×10^6 単位を回収する。比活性は 1.8×10^6 単位/ mg である。

工程 3 (抗 TNF 抗体)

血清より得た TNF を工程 2 の如く部分精製し、フロイントの完全アジュvant を $1:1$ で混合し、12 週令の雄 BALB/c マウスの背部皮下に注射する。2 週後、及び 4 週後にこの操作を繰返し、

更に1週後に全採血し、その血清を取得する。

この血清をL細胞障害活性を測定する培地中に終濃度500倍希釈となるように添加し、ウサギ血清から得たTNFのL細胞障害活性を参考例1に示す方法で測定すると、L細胞障害活性は認められない。ここに得られるマウス血清は、ウサギ血清TNFに対する抗体(抗TNF抗体と称する)を含むものと結論できる。

工程4 (TNF産生細胞取得)

雌ウサギにホルマリンにて死菌処理したプロピオニバクテリウム・アクネス(Propionibacterium acnes) [コリネバクテリウム・バーバム(Corynebacterium parvum)、ウエルカム社、英国]を静脈内投与し、7日後に気管切開し、肺を生理食塩水で洗浄することにより浮遊性細胞を得る。この細胞を生理食塩水で洗浄後、10%ウシ胎児血清(フロー・ラボラトリー社、米国)を含むRPMI 1640(フロー・ラボラトリー社、米国)を培地とし、炭酸ガス5%含有空気を雰囲気とする炭酸ガスインキュベーターにて、37°Cで培養する。

⑤) (ニュー・イングランド・スクレア社、米国)により処理し、乾燥後、X線フィルム(フジRX、富士写真フィルム)に密着露光せしめる。エンドトキシン存在下に培養した培養上清に、分子量約17500の物質の生成が認められる。

また工程4における細胞培養の上清を上記と同様にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に付した後、2.5%NP40^⑥(カルビオケム社、米国)で1時間、水中で2時間振とう後、各泳動レーンを切断分離し、泳動方向に直角に2mm巾にスライスする。各スライス断片をL細胞と共に培養することにより、L細胞障害活性を調べる。エンドトキシン存在下に培養上清を展開したレーンの分子量約17500の位置にL細胞障害活性が認められ、その他の位置には細胞障害活性は認められない。

工程6 (mRNAの抽出)

工程4と同様な細胞培養においてエンドトキシンを添加後2時間培養したのち、遠心分離にて細胞(ウサギ肺洗浄細胞)を集める。細胞質RNA

培養液を2コに分け、一方には大腸菌由来のエンドトキシン[大腸菌O26:B6由来のリポボリサツカライド、ディフコ社、米国]を10μg/mlとなるように添加し、一方には同量の滅菌水を添加する。エンドトキシンを添加した培養上清にL細胞障害活性が出現し7時間で最高値に達する。この活性は抗TNF抗体で消去されるが、正常マウス血清では消去されない。

一方、エンドトキシンを添加しない細胞培養上清にはL細胞障害活性は認められない。

工程5 (TNFの分子量)

工程4における細胞培養においてエンドトキシンと共に放射性L-[³⁵S]メチオニン(1300Ci/mmol、アマーシャム社、英国)を1mCi/mlとなるように添加して培養を行う。培養上清をレムリの方法[Laemmli, U. K. (1970) Nature (London) 227巻680~685頁]に従ってSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析する。ゲル濃度は12.5%となるよう調製する。泳動後エンハンス(ENHANCE

およびその中からのmRNAの抽出は下記の如くチャーグイン(Chirgwin)らの条件(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry 18巻5294頁(1979年)]に従って行なう。細胞3×10⁸個に対して4mlの4Mグアニジンチオシアネート溶液を加え、ホモジナイザー(AM-7、日本精機製作所)にて破碎する。残渣を遠心除去後、2.4gの塩化セシウムを溶解し、あらかじめ2.5mlの5.7M塩化セシウム、0.1M EDTA溶液(pH7.5)を入れてあるポリアロマーチューブへ静かに重層する。

ベックマンSW41ローター(ベックマン社、米国)を用いて20°C 30000rpmにて12時間、超遠心分離を行った後、上清を除き、ペレットを10mMトリス-塩酸緩衝液(5mM EDTA, 10% SDSを含有する)1mlにて溶解する。この溶液を1mlのクロロホルムと1-ブタノールの混液(容積比4:1)で抽出し、水層に0.05容積の2M酢酸ナトリウムと、2.5容積のエタノールを加え、-20°Cで2時間以上放置してR

NAを沈殿させる。遠心にて沈殿を集め、乾燥させたのち滅菌水500μlに溶解して、細胞質RNA溶液を得る。

上記細胞質RNA溶液を68℃、2分間加熱後急冷し、500μlの2倍濃度の10mMトリスEDTA緩衝液pH7.4(1mM EDTA, 0.1%v/v SDS及び0.5M塩化リチウムを含む)を加え、200μlのオリゴ(dT)-セルロース(BRL社、米国)カラムに展開、1倍濃度の上記バッファー10mMで洗浄、溶出緩衝液(10mMトリス-塩酸pH7.4, 1mM EDTA, 0.1%v/v SDSを含む)2mlで溶出する。溶出液に0.05容積の酢酸ナトリウム、2.5容積のエタノールを加えて-20℃に冷却して沈殿せしめる。沈殿を遠心にて集め、再度同様にオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着する画分を集め。紫外吸収スペクトル分析により、85μgのmRNAを回収する。

(以下余白)

た分画mRNAを1μg/μlになるように滅菌水に溶解し、卵母細胞1個あたり、50nMずつを微量注入し、1mg/mlのウシ血清アルブミンを含有するBarth培液(7.5mMトリス-塩酸pH7.6, 88mM塩化ナトリウム、1mM塩化カリ、0.33mM硝酸カルシウム、0.41mM塩化カルシウム、0.82mM硫酸マグネシウム、2.4mM重炭酸ナトリウム、180U/mlベニシリング、18μg/mlストレプトマイシンを含有する)中で24時間培養する。培養液のまま卵母細胞をガラス棒でつぶし、遠心後、上清のL細胞障害活性を測定する。沈降定数16S付近において、L細胞障害活性が最高値を示す。またこの活性は工程6で得た抗TNF抗体により消去されるが正常マウス血清では消去されない。

工程9(形質転換体の取得)

工程7で得た分画mRNA 5μgを用い、実験書(1)96頁以降に従って二重鎖DNAを調製する。逆転写酵素はライフサイエンス社(米国)のものを使用する。二重鎖DNAを3.5%ゲル

工程7(mRNAのサイズ分画)

工程6と同様にして得られるmRNA 880μgを250μlの水に溶解し、5-25%直線ショ糖密度勾配10mlに重層する。ショ糖密度勾配は、5および25%のショ糖を各々含むトリス緩衝液(25mMトリス塩酸pH7.2, 2mM EDTA, 1%v/v SDSを含有する)を用い、ISCO570グラジエンター(イスコ社、米国)により作製する。

ベックマンSW41ローターを用い、4℃40000rpm、12時間の超遠心を行ったのち分画回収装置(ベックマン社、米国)により各400μlの分画を回収する。各分画はエタノール沈殿し、遠心後滅菌水に溶解する。

工程8(mRNAの粗粗実験)

アフリカジメガエル卵母細胞によるmRNAの粗粗は、実験書(例えば寺岡宏、五木幹男、田中英太郎、蛋白質、核酸、酵素、臨時増刊、遺伝子操作、602頁1981年)に依る。アフリカジメガエルは、浜松生物教材より得る。工程7で得

た濃度のポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分画し、長さ約1000~2000bpの画分330ngを得る。この画分7ngを用い同上の実験書に従い、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(BRL社、米国)を用いてデオキシンG鎖をつなぎ、同様にPstI部位にデオキシンG鎖をつないだプラスミドpBR322 56ngとアニールせしめる。アニール後の混合物を用いて大腸菌K-12株(HB101, ATCC33684)を形質転換し、2000株の形質転換体を得る。

工程10(ウサギTNFの部分アミノ酸配列)

工程2で部分精製するTNFを、工程5におけると同様にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製する。一部をクマシーブリリアント・ブルー染色し、分子量約17000の位置に対応するバンドをゲルから切出し、1%重炭酸アンモニウムにより抽出する。5×10⁷単位のTNFを使用し、蛋白として約180μg回収する。

このうち150μgを1%重炭酸アンモニウム75μlに溶解、TPCKトリプシン(ワシントン・

バイオケミカル社、米国) 3 μ gを添加し、37°C、4時間インキュベートする。反応液をコスモシリ5C8(半井化学)を粗体とする高速液体クロマトグラフィーにより分画し、トリプシン消化断片を得る。

上記の如く高純度に精製したTNFおよびそのトリプシン消化断片は、次に、セファデックスG-25のカラムで脱塩し、凍結乾燥する。アール・エム・ヒューイック(R. M. Hewick)らの方法(J. Biol. Chem. 256巻7990-7997頁、1981年)に準じて、N末端よりエドマン分解を行なう。各ステップにおいて遊離してくるフェニルチオヒダントインアミノ酸は、高速液体クロマトグラフィー、モデルSP8100(スペクトラフィジックス社、米国)を用い、ソルバックスODS(デュポン社、米国)をカラムとして、常法により分析する。この結果、TNFのN末端側からのアミノ酸配列は下記の通りである。

Ser-Ala-Ser-Arg-Ala-Leu-Ser-Asp-Lys-Pro-Leu-Ala-His-Val-Val-Ala-Asn-Pro-

0%ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び、DE52(ワットマン社、米国)カラムクロマトグラフィーにより精製し、0.1mMトリス-EDTA緩衝液に対し透析する。

各々の精製オリゴDNAを常法によりT4ポリヌクレオチドキナーゼ(ベセスダリサーチラボラトリーズ社、米国)および γ - 32 P-アデノシントリリン酸を用いて放射性ラベルし、DE52カラム(ワットマン社、米国)により精製する。各々、約 3×10^6 cps/ μ gの放射能が導入される。各グループの混合物の形で得られたオリゴDNAプローブを第1表に示すように命名する。

第1表にウサギTNFのアミノ酸配列の一部とウサギTNFのアミノ酸配列から推定されるmRNA塩基配列、およびこれに基づく各グループの合成オリゴDNAのプローブの塩基配列を示す。

(以下余白)

Gln-Val-Glu-Gly-Gln-Leu-Gln-

トリプシン消化断片のうちの1つは、そのN末端より下記のアミノ酸配列をもつ。

Glu Thr Pro Glu Glu Ala Glu Pro Met
Ala

工程11(オリゴDNAプローブの合成)

工程10で得たTNFのアミノ酸配列から推定されるmRNAの塩基配列に対し、相補的な、オリゴDNAを合成する。合成方法は、伊東らが既に発表している改良リン酸トリエステル法[エイチ・イトウ等(H. Ito et al.), ヌクレオティックアシッズリサーチ(Nucleic Acids Res.), 10巻, 1755-1769頁、1982年]により行う。

アミノ酸配列から推定される128種類のオリゴDNAを5グループに分け、各々16、16、32、32、32種類の混合物として合成する。各々を常法に従って脱保護し、セファデックスG-50(ファルマシア社、スウェーデン)を用いるカラムクロマトグラフィー、7M尿素を含む2

アミノ酸配列		カルボキシ末端...Ala Met Pro Glu Ala Glu...アミノ末端	
mRNA	3'XCG GTA XCC YAG YCG YAG YAG.....5'	
プローブM.H	5'	GC CAT MGG MTC MTC MTC	3'
" M.I.	5'	GC CAA MGG MTC MTC MTC	3'
" M.J.	5'	GC CAT ZGG MTC AGC MTC MTC	3'
" M.K.	5'	GC CAT ZGG MTC CGC MTC MTC	3'
" M.L.	5'	GC CAT ZGG MTC TGC MTC MTC	3'

(XはA, C, G, Uのうちのいずれか。YはAまたはGのリボ核酸塩基を示す。MはTおよびC, NはAおよびG, ZはA, C, G, Tのすべてのデオキシリボ核酸塩基を示す。)

工程6に従って得たTNF産生細胞のmRNAを1Mグリオキザール、50重量%ジメチルスルホキシド及び10 mM NaH₂PO₄の存在下に50℃60分間処理したのち、1.1重量%アガロースゲル電気泳動により分画する。分画後のmRNAを、電気泳動式トランスファーブロティング装置(バイオラッド社、米国)を用いて、メーカーのマニュアルに従い、移動せしめる。次いで、この膜上のmRNAと、5×SSC及び150 μg/mlの変性サケ精子DNAを含む5×デンハルト溶液で65℃、2時間処理したのち、放射性標識したオリゴDNAを1×10⁷ cpm/ml、5×SSC溶液を含む5×デンハルト溶液で50℃、2時間処理する。次いでこの膜を6×SSCで室温、40℃、50℃、60℃で順次洗浄し、X線フィルムXAR-5(イーストマン・コダック社、米国)に対し露光せしめる。この結果、mRNAと最も強くハイブリダイズするオリゴDNAはMJであって、MJ混合物中にmRNAと完全に相補的な配列を有するオリゴDNAが含まれていること

が判明する。

工程12(ウサギTNF遺伝子のクローニング)

工程9で得られる形質転換体を実験書(2)162頁の方法に従ってセルロースフィルタ-上に移し、そのDNAと、工程11で選択される放射性標識オリゴDNA(MJ)とを工程11と同様の条件でハイブリダイズせしめる(コロニー・ハイブリダイゼーション)。強くハイブリダイズする株49個を選び更にフィルター上に固定して再度コロニー・ハイブリダイゼーションを実施し、標識オリゴDNA(プローブMJ)により強くハイブリダイズする9個を選ぶ。

この9個の株から、実験書(1)の6頁の迅速プラスミド分離法に従って各々約5 μgのプラスミドを取得する。このプラスミドを制限酵素PstI、TagI、RsaI、PvuII(いずれもBRL社、米国)を用い、メーカーのマニュアルに従って切断し、1重量%アガロースゲル電気泳動で、各々の酵素による切断片の長さを比較する。

この結果、9株すべてが、約50 bpのPvuII

とRsaIによる断片を有し、9株のほとんどがRsaIによる約200 bpの断片を有し、部分的に共通の配列を有することが示唆される。第8図に制限酵素による解析結果を図示する。

また、このうち7株を10 μg/mlのテトラサイクリンを含む2 mlのLB培地で吸光度が第2表に示す値になるまで培養し、遠心にて集めた菌体を2 mlの生理食塩水中で超音波により破碎し、遠心上清のL細胞障害活性を測定すると、第2表に示す如く、L細胞障害活性を示す。対照実験としてプラスミドpBR322を含有する株を用いて同様の操作を繰り返して行なう。結果を第2表に示す。

(以下余白)

第2表

プラスミド	インサート の塩基数	OD ₆₀₀	L細胞障害 活性 単位/ml
pB2-2	1400	1.369	35
pB2-3	800	1.605	<10
pB2-7	1060	1.364	<10
pR8	1550	1.618	<10
pR12	1400	1.458	15
pR18	1850	1.438	<10
pR25	1350	1.514	<10
pBR322	0	1.677	<10

またこの活性は抗TNF抗体により消去され、正常マウス血清では消去されない。従ってこの9株すべてがTNF遺伝子を含むプラスミドを有していることが示される。

工程13(ウサギTNF遺伝子の塩基配列の決定)

プラスミドpB2-7、およびpR18を含有する大腸菌株を、10 μg/mlのテトラサイクリンを含有するM9培地〔実験書(3)440頁〕1L中で培養した後、実験書(3)90頁の方法に従ってプラスミドを単離し、各々約150 μgを得る。

各々の塩基配列をマキサム-ギルバート(Maxam-Gilbert)法(マキサム等 (Maxam et al.), メソッド イン エンザイモロジー(Method in Enzymology), 55巻, 490頁, 1980年, アカデミック プレス(Academic Press)]に従って決定する。また、この塩基配列と工程10で決定された部分アミノ酸配列の一致により、ウサギTNF蛋白の全構造が解明される。

工程14

プラスミドpR12の粗換体を用いて大腸菌内でlacをプロモーターとしてTNFを発現させることを目的にプラスミドの構築を行なう。第9図に示す様に10 μgのプラスミドpR12を10ユニットのApaI(ビー アール エル (B R L)社)で37℃で2時間消化し、4%のポリアクリルアミ

ドゲル電気泳動で約630 bp断片を単離する。約1 μgの断片がゲルから電気泳動溶出する。工程11と同様の方法によって第2図に示す2個デオキシオリゴヌクレオチド即ち、5'-GATCCATGTCAGCTTCCTGGGCC-3' と 5'-CGAGAAGCTGACATG-3' を合成し、実験書(3)122頁に従って約100pmoleの各デオキシオリゴヌクレオチドの5'末端をT。ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化する。反応終了後、反応混合物をフェノールを用いて抽出し、さらにクロロフォルムを用いて抽出した後、オリゴマーを0.5 μgの約630塩基対のApaI断片と合せてエタノール沈澱させる。実験書(1)37頁に従って10ユニットのT,DNAリガーゼで前記の断片を4℃で1夜反応させ結合する。反応終了液をエタノール沈澱後、20ユニットのBamHIで37℃3時間消化し、4%のポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、約670 bpの断片を電気泳動溶出により回収する。市販のプラスミドpUC-8 (P-Lバイオケミカル社、カタログ番号4916、米国) 1 μg

をBamHIで消化してフェノール抽出、クロロフォルム抽出、エタノール沈澱をして調製したベクタ-0.5 μgに約670 bpのTNFの構造遺伝子を含む両端にBamHIサイトを持った断片をT,DNAリガーゼを用いて結合する。実験書(4)、20頁に従って、大腸菌JM103株を形質転換して1 mM IPTG及び0.004% (v/v) x-galを含む選択培地で培養して約200個の白色コロニーを得る。これらの形質転換体100個からプラスミドDNAを調製し、BamHIで消化したところ、15個が目的の約670 bpのBamHI断片を含んでいる。さらに、挿入の方向を調べるために、上記15個のプラスミドをpUC-8上に1ヶ所しか認識部位がないEcoRIとPvuII(約670 bpの断片上に認識部位がある)を用いて消化し、6重量%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて調べることにより、7個のプラスミドから目的の約140 bpの断片が確認され、pUC-8上のlacプロモーターから順方向であることが判明する。

塩基配列の解析により、この7個のプラスミド

は同一で、lacプロモーター、合成DNA及びcDNA間の結合部に所望のヌクレオチド配列を有することが確認される。

プラスミドpR17を用いて、大腸菌内でlacUV5をプロモーターとしてTNFを直接発現させることを目的にプラスミドの構築を行なう。第10図に示す様に10 μgのプラスミドpR17を10ユニットのApaI(ビー アール エル (B R L)社)で37℃2時間消化し、4%のポリアクリルアミドゲル電気泳動で約630 bpの断片を単離する。約1 μgの断片がゲルから電気泳動溶出する。工程11と同様の方法によって第3図の2個のデオキシオリゴヌクレオチド即ち、5'-AAITCATGTCAGCTTCCTGGGCC-3' と 5'-CGAGAAGCTGACATG-3' を合成し、実験書(3)122頁に従って約100pmoleの上記2種のデオキシオリゴヌクレオチドの5'末端をT。ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化する。反応終了液をフェノールを用いて抽出し、さらにクロロフォルム抽出した後、先に得たpR17のApaI消化断片(約630

b p) 0.5 μ gと合わせてエタノール沈殿する。実験書(1)37頁に従って10ユニットのT.リガーゼで4℃一夜反応させ、結合せしめる。反応後、反応液をエタノール沈殿し、20ユニットのEcoRIで37℃3時間消化し、4%のポリアクリルアミドゲル電気泳動により約670 b pの断片を回収する。

プラスミドpOP 95-15は、フラーの方法(エフ・フラー (F.Fuller), ジーン(Gene), 19巻, 42頁~54頁, 1982年)に従って調製する。

pOP 95-15の1 μ gをEcoRIで消化してエタノール抽出、クロロフォルム抽出、エタノール沈殿をしてベクターを調製する。ベクター0.5 μ gは、上記の如く合成デオキシオリゴヌクレオチドと、TNFをコードするDNAを結合して得られる約670 b pの断片に、T.DNAリガーゼを用いて結合される。実験書(4)、20頁に従って、大腸菌JM101 (ATCC 33876) を形質転換して1 mM IPTG及び0.004% (v/v) Zal を含む

工程15 (大腸菌が產生するTNFの精製)

工程14で得られたプラスミドを含有する大腸菌株を100 μ g/mLのアンピシリンを含有するLB培地に50 mL中37℃で一夜培養し、5 mLの同上の培地に移して更に3時間培養する。インプロピル β -D-チオガラクトピラノシド(シグマ社、米国)を終濃度1 mMになる様に添加し更に、6時間培養を続けたのち冷却し、遠心分離により菌株を集め。工程14におけると同様に菌体を0.04 Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.8) 5 mL中で超音波破碎し、菌体蛋白溶液を得る。この溶液は5 \times 10⁷単位/mLのL細胞障害活性を示す。

この溶液を工程2と同様に精製し1.2 \times 10⁶単位のTNFを得る。このものの比活性は6.8 \times 10⁷単位/ μ gである。

工程16 (メス エイ ザルコーマ (Meth A sarcoma) 細胞マウスを用いる活性評価)

BALB/cマウスの腹部皮内に2 \times 10⁶個のメス エイ ザルコーマ (Meth A sarcoma) 細胞を移植

寒天培地上に約150個の白色コロニーを得る。

これらのコロニー100個からプラスミドDNAを調製し、EcoRIで消化したところ12個が、目的の約670 b pのEcoRI断片を有している。さらに挿入の方向を調べるために上記12個のプラスミドをPvuIIとPstIを用いて消化し、1.5重量%アガロースゲル電気泳動を用いて調べると4個のプラスミドから目的の約1280 b p及び2600 b pの断片が確認され、lacUV5プロモーターから順方向にTNF遺伝子が接続されていることが判明する。

塩基配列の解析により、この4個のプラスミドは同一で、lacUV5プロモーター、合成デオキシオリゴヌクレオチド、及びcDNAが正しく結合されていることが確認される。得られるプラスミドをpTNF-1acUV5-1と命名する。

(以下余白)

する。7日後、移植した腫瘍の大きさが直徑7~8mmとなり、出血性壞死などなく良好な血行状態にあるマウスを選び、尾静脈より生理食塩水で希釈した0.5 mLの工程15で得られるTNF試料を注射し、24時間後に次の判定基準により判定を行なう。

(-) : 変化なし

(+) : かすかな出血性壞死

(++) : 中程度の出血性壞死(移植癌表面の真中から50%以上にわたって壞死)

(+++) : 顕著な出血性壞死(移植癌の中央部が重度に壞死し、周囲の癌組織がわずかに残った状態)

また、試料投与後20日目に癌が完全に退縮したかどうかを観察し完治率を求める。

以上の方針により測定し、大腸菌の生産するTNFの活性を第3表に示す。

$$\text{完治率} = \frac{\text{完全に癌が退縮したマウス数}}{\text{実験マウス数}}$$

分注し、前述のプラスミドDNA溶液 $1.0\mu\text{L}$ をそれぞれに加える。

該混合液をそれぞれ30分間氷冷した後、44℃で60秒ヒートショックを与え、ただちに、あらかじめ37℃に温めておいた5mLのLB培地を加える。この溶液を37℃で1時間培養した後、それぞれの溶液を遠心し、上清を除去し、細胞ペレットを得る。該細胞ペレットにLB培地を加え、搅拌した後、懸濁液とする。該懸濁液を $30\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリンを含むLB寒天プレートにまき、37℃で1夜培養を行なう。その結果、プラスミドpR18、pB2-7とpB2-2からそれぞれテトラサイクリン耐性形質転換菌のコロニーが得られる。

工程2 (pB2-7とpR18プラスミドDNAの調製)

工程1で得られるプラスミドpB2-7とpR18の形質転換体を下記の報文の方法に従って培養し、プラスミドを増幅させる。次いで得られる形質転換体を集菌し、破碎したのち、プラスミドDNA

大腸菌の 生産するTNF 単位/匹	匹数	致死の程度(1日目)				完治率 20日目
		-	+	++	++	
2×10^4	5	0	0	1	4	5/5
対照 生理食塩水	5	5	0	0	0	0/5

参考例3

工程1 (プラスミドpR18、pB2-7、pB2-2の大腸菌K12、MC1061株への形質転換)

参考例2で得られる上記3種のプラスミドを常法に従って大腸菌K12MC1061株へ形質転換する。詳しくは大腸菌K12MC1061株のコロニーをLB培地を用いて、 550nm の吸光度が0.3になるまで培養する。該培養物 50mL を集め、 25mL の 1.0mM RbCl を含む 1.0mM MOPS (pH 7.0)溶液で洗浄し、次いで 50mM CaCl_2 、 1.0mM RbCl を含む 0.1M MOPS (pH 6.5)に再び懸濁する。

該懸濁液を30分間氷冷し、遠心後、上清を除去し、 $30\mu\text{L}$ のDMSOおよび 6.0mM CaCl_2 と 1.0mM RbCl を含む 0.1M MOPS (pH 6.5)の混合液中に懸濁させる。該懸濁液を $200\mu\text{L}$ ずつ

を精製する。[実験書(3)、88-96頁]

すなわち、LB培地に、それぞれの形質転換体を植菌し、激しく振とうしながら37℃で培養する。

次いで、この工程をくりかえして形質転換体を増殖させ、更にプラスミドを増幅させる。次に、得られる形質転換体の培養液を4℃に冷却しながら、 4000g で10分間遠心を行ない、上清を除去する。

氷冷STE [0.1M 塩化ナトリウム、 1.0mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.8)と 1mM EDTA]の 1.00mL を用いて洗浄し、続いて 1.0mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)の中に $2.0\text{mg}/\text{mL}$ のリゾチームを含む水溶液を用いて細胞を煮沸溶菌する。得られる粘性液体を超遠心チューブに移し入れ $25,000\text{rpm}$ 30分間4℃で遠心を行なってDNA溶液を得る。

該DNA溶液の容量を測った後、該溶液 1mL 当たりに、固体の塩化セシウム 1g を加え、塩化セシウムが完全に溶けるまで、ゆっくりと注意深く

搅拌する。該塩化セシウム水溶液の 1.0mL 毎に、 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ のエチジウムプロマイド水溶液 0.8mL を加える。この結果、該溶液の最終比重は $1.55\text{g}/\text{mL}$ 、エチジウムプロマイドの最終濃度は約 $600\mu\text{g}/\text{mL}$ となる。

該塩化セシウム水溶液を適当な遠心チューブに移し、空隙に軽パラフィンオイルを加え、 20°C で36時間、 $45,000\text{rpm}$ の遠心を続けると上層に糸状の微生物由来DNAとニックの入った環状プラスミドDNAと、下層に閉環状プラスミドDNAがくる。下部のDNAのバンドをチューブの横に注射針をさしこんで採取しガラスチューブに移す。エチジウムプロマイドを除去し、水層をTAE緩衝液に透析する。プラスミドDNA溶液をRNase処理し、等量の飽和エタノール溶液で抽出する。水層をあらかじめ $0.1\% SDS$ を含むTAE緩衝液(pH 8.0)で平衡化したバイオゲル(Bio-gel) A-150に付す。DNAを洗い込み、活性画分を取得する為に $0.1\% SDS$ を含むTAE緩衝液で溶出する。分画液をエタノール

で沈殿させ、精製したプラスミドDNAを得る。
上記の方法により、精製pB2-7プラスミドDNAが250 μ g、pR18プラスミドDNAが134 μ g得られる。

工程3 (精製pB2-7とpR18プラスミドDNAのニックトランスレーション)

工程2で得られる精製プラスミドDNA 40 μ gを制限酵素 PstIで消化分解し、次いで4%アクリルアミドゲル電気泳動にかける。

電気泳動後、染色を行ない目的とするバンドを切出してPstIインサートを単離する。500ngの該PstIインサートを用いて、ティ・マニアティス(T. Maniatis)らの方法(プロスィーデングズオブザナショナルアカデミー・オブ・サイエンシスオブザユナイテッドステイツオブアメリカ(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 72, 1184(1974))に従ってニックトランスレーションを行なった。ニックトランスレーションは市販キット(ビー・アール・エル(BRL)社)を用いる。

工程2で得られる精製pR18を用いて、同様に上記の方法に従ってニックトランスレーションを行なう。比活性は7×10⁷cps/ μ gDNAである。

工程4 (pR18プラスミドDNAのRsaI断片取得)

80 μ gのpR18プラスミドDNAを制限酵素 RsaIで消化し、4%アクリルアミドゲル電気泳動に付す。下記の目的とするインサートのバンドを切出しENDカラムを用いて精製する。

約640bp 3.77 μ g (回収率52%)

約175bp 1.77 μ g (回収率50%)

この約640bpのインサートをpR18の3'断片(pR18の3'側の翻訳されない部分を意味する)、約175bpのインサートをpR18-cfr(pR18のコード部分)と命名する。

更に上記に於いてRsaIの代わりにPstIとMstIIを用いて消化して、約450bpの断片3.65 μ g(回収率60%)を得る。このインサートはpR18の5'断片と命名する。

25 μ lの反応系中で放射化したdCTPを80pmole用いる(400Ci/moleの場合)。

まず下記混合溶液を調製する。

2.5 μ l 溶液A (dNTP溶液)

2.5 μ l 溶液B (500ngのDNA、すなわちPstIインサート)

5 μ l 放射性dCTP

(3200Ci/mole)

1.3 μ l dCTP (65pmole, 50pmole/ μ l dCTP)

11.2 μ l 溶液E (H₂O)

計22.5 μ l

この22.5 μ lの溶液に、2.5 μ lの溶液C(DNase I, DNAポリメラーゼI)を加え、15℃60分反応させる。

次いで、溶液D(停止緩衝液)を加え、停止させる。更に、キャリアー tRNAを加えエタノール沈殿を2回行ない、次いで500 μ lの水に溶解する。

比活性は、8.3×10⁷cps/ μ gDNAである。

工程5 (ヒト染色体TNF遺伝子の単離)

参考例3の工程3で得られる³²Pラベル化プラスミドpB2-7インサートをハイブリダイズ用プローブとして用い、シャロン4AのEcoRI切断サイト(ブラットナー(Blattner)らの方法、サイエンス(Science), 196, 161(1977))にヒトDNAを部分消化しサイズ分画した断片(マニアティス等(Maniatis et al.), セル(Cell), 15, 687(1978))を組込んで作成したバクテリオファージシャロン4A/ヒト染色体遺伝子ライブラリーの10⁶個のブラークをスクリーニングする。その方法として(ベントン及びダビス(Benton and Davis), サイエンス(Science), 196, 180(1977))を用いる。

出発培養液中のバクテリオファージの總てが、該生理活性物質を作成する為に必要な遺伝子材料を含んでいるとは限らないので、ウサギTNFの遺伝子に相補的な配列を持つプローブを用いる。

目的とする遺伝子を含むファージブラークは、放射活性を有するプローブとハイブリダイズし、

その放射能活性により見つけることができる。このようにして9つのハイブリダイズブラークが、該ライブラリーから得られる。

方法と条件は次の通りである。

- 1) ブラーク数: $\sim 1 \times 10^6$ ブラーク ($\sim 4 \times 10^4$ ブラーク/ $\phi 150 \text{ mm}$ プレート $\times 25$)
- 2) ニトロセルロースフィルターへの転写:
(ベントン及びダビス(Benton and Davis), サイエンス(Science), 196, 180 (1977) 参照)
- 3) ハイブリダイズ: $1.25 \times 10 \text{ cps}/\text{ml}$ の参考例3工程3で得たpB2-7インサートブロープの添加、42°C、19.5時間
- 4) 洗い: $2 \times \text{SSC} - 0.1\% \text{ SDS}$ を用いて室温で10分間洗いを4回、続いて $1 \times \text{SSC} - 0.1\% \text{ SDS}$ を用いて50°Cで30分間洗いを2回
- 5) 露光: XAR-5、-80°C、2枚の増感紙、39時間

上記スクリーニングで12の候補株が得られる。

のブラークの代わりに用いる。

ウサギ染色体遺伝子を含む2つのバクテリオファージ(RG-1, RG-2)が得られる。

(以下余白)

上述と同様の方法で二次スクリーニングを行ない所望の断片を有する9個の株を得る。これらの株を用いて上述と同様の方法で三次スクリーニングを行ない所望の断片を有する8個の株を得る。この9個の株について上述と同様の方法で4次スクリーニングを行ない、9個の株が所望の断片を含むことを確認する。所望の断片を含む8個のバクテリオファージを、それぞれHG 1~HG 8と命名する。

工程6 (ウサギ染色体TNF遺伝子の単離)

消化ヒトDNAの代りに消化ウサギDNA

(マニアティス等(Maniatis et al), セル(Cell), 15, 687 (1978)) を用いて調製した 10^6 個のバクテリオファージ シャロン4A/ウサギ染色体遺伝子ライブラリーのブラークを用いる以外は参考例3工程5と実質的に同様の操作を行なう。 6.7×10^6 個のバクテリオファージ シャロン4A/ウサギ染色体遺伝子ライブラリーのブラークを 10^6 個のバクテリオファージ シャロン4A/ヒト染色体遺伝子ライブラリー

工程7 (ヒト遺伝子クローンのサザンプロット解析)

参考例3工程5で得られたHG-3, HG-6, HG-7のバクテリオファージを用いて、それぞれDNAを次の方法に従って得る。

6×10^6 個の大腸菌LE392(宿主)を 18 ml のSM中に懸濁し、そこにバクテリオファージHG-3の $3 \times 10^6 \text{ PFU}$ を加え、37°Cで20分間感染させる。次いで得られる混合液を3mlのNZプロスに加え、37°C、23時間搅拌培養する。次いで60mlのクロロホルムを該混合液に加えて30分間搅拌する。最終濃度1Mとなるように混合液中に更に塩化ナトリウムを加えた後15分間放置する。次いで遠心操作を行なって上清を得る。次いで得られる上清に分子量約6000のポリエチレングリコールをポリエチレングリコールの濃度が10% (w/v) になるように加えて、4°C、22時間放置する。次いでバクテリオファージを遠心操作を行なって採取する。得られるバクテリオファージをSMの28mlに

懸濁し、次いでクロロホルムを等量加える。ボルテックスミキサーで30秒間混合した後、遠心して水層を集め、その全量をSMで30mlにする。これに26.4gの塩化セシウムを加え、静かに溶解した後、超遠心(45000rps、20時間)でファージのバンドを採取する、10mM塩化ナトリウムと10mM塩化マグネシウムを含む50mMトリス緩衝液(pH8.0)に透析した後、それぞれの最終濃度が20mM、50μg/ml、0.5%となるようにEDTA、プロテイナーゼK、SDS、を加え65℃で1時間処理する。次にフェノール、フェノール：クロロホルム=1:1(容積比)、クロロホルムで各1回ずつ抽出し、得られる水層を1mM EDTAを含む10mMトリス緩衝液(pH8.0)で透析する。この溶液の紫外線吸光度を測定すると、バクテリオファージHG-3の純粋なDNAが得られることが確認される。バクテリオファージHG-3のDNAを調製するために用いられる方法と実質的に同じ方法を応用することにより、バクテリオファージHG-6とHG-7

のDNAを得る。

このようにしてHG-3、HG-6、HG-7のDNAを各々2920μg、1100μg、818μgを得る。次いでサザーン(Southern)法[イー・エム・サザーン、ジェイ・モル・バイオル(E. M. Southern, J. Mol. Biol.), 98, 503 (1975)]に従って、以下の実験条件でこれらのDNAのサザンプロッティングを行なう。

1) DNA:

HG-3	825ng
HG-6	935ng
HG-7	685ng

2) 各種制限酵素による分解:

<u>Bam</u> H I	10単位、 <u>Eco</u> R I 10単位、
<u>Bam</u> H I	10単位 + <u>Eco</u> R I 10単位、
<u>Hind</u> III	10単位、
<u>Hind</u> III	10単位 + <u>Eco</u> R I 10単位、
<u>Pvu</u> II	10単位
37℃ 3時間	

3) 電気泳動:

0.8%アガロースゲル

TAE

28V、15.5時間

4) ニトロセルロースフィルターへの転写:

(イー・エム・サザーン、ジェイ・モル・バイオル(E. M. Southern, J. Mol. Biol.), 98, 503 (1975) 参照)

5) プレハイブリダイズ:

30ml FDSS

42℃ 6時間

6) ハイブリダイズ:

pR18の5'-断片(1×10⁶cpm/ml、

参考例3工程4にて調製したもの)を含む

42℃、14時間

7) 洗い:

2×SSC-0.1%SDSを用いて室温で

10分間洗いを4回、続いて1×SSC-

0.1%SDSを用いて50℃で30分間洗

いを2回

8) 露光:

XAR-5(イーストマン・コダック社、米国) -80℃、2枚の増感紙

14時間ハイブリダイズの結果は、第4表に示す。

(以下余白)

工程8 (ウサギ遺伝子クローンのサザンプロット解析)

参考例3 工程7において、HG-3, HG-6, HG-7のかわりにRG-1, RG-2のバクテリオファージのそれぞれを用いる以外は、実質的に同様の操作によってサザンプロット解析を行なう。その結果、pR18の5'断片はRG-1およびRG-2をBamHI, EcoRI, BglII, HindIIIおよびBamHI+EcoRIのそれぞれで分解して得られる断片の、単一バンドにハイブリダイズすることがわかる。

工程9 (ヒト染色体のTNF遺伝子を含むバクテリアクローンの構築)

工程5において得られたHG-3のDNAを、ランディ(Landy)らの方法(バイオケミストリィ(Biochemistry), 13, p. 2134 (1974))によって得る。このHG-3のDNA 33 μgをEcoRIの80単位によって37°Cで3時間分解する。分解物は1%低融点アガロースゲル(条件: 1×TAE, 20V, 14.5時間)にて電気泳

酵素	クローン(バクテリオファージ)	プローブ(pR18)とハイブリダイズする断片の大きさ	
		5' 末端	3' 末端
BamHI	HG-3	6.7kb	←
	-6	11.2kb	←
	-7	9.2kb	←
BamHI + EcoRI	HG-3	2.9kb	←
	-6	"	←
	-7	"	←
EcoRI	HG-3	"	←
	-6	"	←
	-7	"	←
HindIII + EcoRI	HG-3	"	←
	-6	"	←
	-7	"	←
HindIII	HG-3	9.7kb	←
	-6	4.1kb	←
	-7	9.7kb	←
PvuII	HG-3	2.2kb	0.9kb
	-6	1.9kb	0.9kb
	-7	2.2kb	0.9kb

←は左と同じ断片がハイブリダイズしたことを示す。

動する。2.9kbのバンドをアガロースゲルより、ティ・マニアティス(T. Maniatis) [モレキュラークローニング, コールドスプリングハーバーラボラトリ(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory), 377 (1982)] の方法で単離する。詳しくは、2.9kbのバンド部位を切り出したゲルを65°Cで15分間加熱する。さらに、この2.9kbの長さを持つEcoRI分解HG-3断片(以後、これを「HG-3/EcoRI 2.9kb断片」と略することが多い)を、溶けたゲルよりエタノールで3回、エタノールで3回抽出、酢酸アンモニウムを含むエタノールで沈澱して回収する。このようにして、637 μg(収率約30%)のHG-3/EcoRI 2.9kb断片を得る。

上記断片255ngとEcoRI分解pUC13(ジェイ・メッシング, メソッドインエンザイモロジー(J. Messing, Methods in Enzymology), 101, 20 (1983))を、2.5単位のT4リガーゼを用いて結合する。

大腸菌K12 JM83株を上で得られる結合

生成物を用いて形質転換する。詳しくは、大腸菌K12 JM83株をLB培地で、培養プロセスの550nmにおける吸光度が0.3になるまで培養する。50mlの増殖した大腸菌K12 JM83株を集め、25mlの10mM MOPS(pH7.0) - 10mM RbClで洗い、25mlの0.1M MOPS(pH6.5) - 50mM CaCl₂ - 10mM RbCl中に懸濁する。この懸濁液203μlに、10ngの上記結合生成物を含む10μlの水溶液を加える。この混合物を氷中にて30分間冷却し、4.2°Cで60秒間加熱する。その後すぐに、あらかじめ37°CにしておいたLBプロセス5mlに、加熱した混合物を加え、37°Cで1時間培養する。得られる培養プロセスを遠心し上清を除去する。遠心した細胞にLB培地を加えて、30μg/mlのアンピシリンと40μg/mlの λ -galを含むLBプレートに植菌する。インサートを含むプラスミドが導入された大腸菌K12 JM83株のコロニーは白色であるが、プラスミドのみが導入された株のコロニーは青色である。得

られる白色コロニーは再び、 $30\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンと $40\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の x-gal を含むLB培地に確認のため植菌する。

上で得られる白色コロニーより、10個のコロニー(バクテリアルクローン)を選び、ホルメス(Holmes)とクイグレイ(Quigley)の迅速法(Anal. Biochem.), 114, p.193 (1981)を用いてスクリーニングする。

詳しくは、それぞれのコロニーを $30\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLB培地で一晩培養する。増殖した細胞を集め、 $2\text{ mg}/\text{ml}$ リゾチーム-5 0 mM グルコース- 10 mM EDTA- 25 mM トリス(Tris)-HCl(pH 8.0)中に懸濁する。この懸濁液を室温で5分間おき、これに $200\text{ }\mu\text{l}$ の 0.2 N NaOH - 1% SDSを加える。ゆっくり搅拌したのち、この懸濁液を2分間室温におく。続いて、 $150\text{ }\mu\text{l}$ の $3\text{ M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)}$ を加え、10分間-20°Cにおき、15分間遠心してその上清を得る。この上清に $900\text{ }\mu\text{l}$ の冷エタノールを加え、5分間遠心してその沈澱

のかわりに大腸菌K12のJM83(pHGE)株を用いる以外は工程2と同じ操作によって、 1.89 mg のpHGE DNAを得る。

工程10(EcoRI分解RG-1のサブクローニング)

工程6において得られる $30\text{ }\mu\text{g}$ のRG-1をEcoRIにより消化する。得られる各種断片の混合物より、上記各種断片の混合物と 0.8% の低融点アガロースゲルを用いる以外は工程9と実質的に同じ操作によって、約 3.5 kb の長さを持つ断片を回収し、 $1.0\text{ }\mu\text{g}$ のEcoRI分解RG-1断片(3.5 kb)を得る。この断片とEcoRIで消化したpUC13を、EcoRI分解HG-3断片(2.9 kb)のかわりに上記EcoRI分解断片(3.5 kb)を用いる以外は工程9と実質的に同じ操作によって、連結する。

大腸菌K12 JM83株への形質転換、バクテリアルクローンのスクリーニング、クローンDNAの分解と電気泳動は、上記結合DNA断片を用いる以外は上記工程9と実質的に同じ操作によって行なう。得られるクローンは大腸菌K12 JM

を得る。得られる沈殿を 70% エタノールで洗い乾燥してプラスミドDNAを得る。この方法を用いて10個のプラスミドを得る。

それぞれのプラスミドDNAを、 1.0 mM トリス(Tris)- 0.1 mM EDTA(pH 8.0)に溶かし、EcoRIで消化し、制限酵素消化のため電気泳動に供する。消化と電気泳動の条件は以下の通りである。

消化：プラスミドDNA培液=上で得られたものの5分の1量、3単位のEcoRI、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、1.5時間

電気泳動：1%アガロースゲル、 $1\times\text{TAE}$ 、 120 V 、2時間

上記の制限酵素解析によって、10種のクローンのうち8種が目的のものであることが示される。すなわち、この8種のクローンは 2.9 kb の断片を持っている。8種の目的のクローンのうち、1つを選び大腸菌K12JM83(pHGE)株(ATCC39656)と名づける。

続いて、pB2-7とpR18を有する大腸菌

83(pRGE)株(ATCC39655)と名づける。

続いて、大腸菌K12JM83(pRGE)株をpB2-7とpR-18のかわりに用いる以外は工程2と実質的に同じ操作によって、pRGE DNAを 1.70 ng 調製する。

工程11(pHGEプラスミドDNAの制限酵素解析)

工程9で得られるpHGE DNAの制限酵素解析を、マニアティス(Maniatis)の方法(モレキュラークローニング、コールドスプリングハーバーラボラトリー(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory), 98頁(1982))によって行なう。

その方法と条件は以下の通りである。

- 1) EcoRIによるpHGE DNAの分解： $18.6\text{ }\mu\text{g}$ のpHGE、64単位のEcoRI、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2時間
- 2) エタノール沈殿：沈殿物
- 3) 溶解：EcoRI分解pHGEが $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の

溶液になるように蒸留水を加える。

4) 各種制限酵素による消化: 1 μ gの上記EcoR I分解pHGE、
制限酵素: 5 単位のPvu II、5 単位のPvu II + 10 単位のRsa I、10 単位のRsa I、4 単位のMst II、3 単位Ava I、9 単位のPst I、3 7 °C、2 時間

5) 電気泳動: 2%アガロースゲル、1 \times TAE 28 V、14.5 時間

6) ニトロセルロースフィルターへの転写: (イ・エム・サザーン, ジェイ・モル・バイオル (E. M. Southern, J. Mol. Biol.), 98, p. 503 (1975) 参照)

7) 第一回プレハイブリダイズ: 30 ml FDS S、42 °C、6 時間

8) 第一回ハイブリダイズ: pR18の5' 断片 (工程4で得られるもの, 5×10^4 cpm/m²) 42 °C、14 時間

9) 洗い: 2 \times SSC - 0.1% SDS を用いて室温で10分間洗いを4回、続いて1 \times SSC

- 0.1% SDS を用いて50 °Cで30分間洗いを2回

10) 露光: XAR-5 (イーストマン・コダック社、米国)、-80 °C、2枚の増感紙、17.5 時間

11) 洗い: 0.5 M NaOH - 1.5 M NaClで1分間、0.5 M トリス(Tris) - 1.5 M NaClで1分間、3 \times SSCで1分間

12) 露光: 露光時間を19時間とする以外は、上記10)と同じ操作

13) 第2回プレハイブリダイズ: 7)と同じ操作

14) 第2回ハイブリダイズ: pB2-7インサート (工程3で得られるもの)、42 °C、16.5 時間

15) 洗い: 9)と同じ操作

16) 露光: 露光時間を19.5時間とした以外は、上記10)と同じ操作

17) 洗い: 11)と同じ操作

18) 露光: 露光時間を20時間とした以外は、上記10)と同じ操作

19) 第3回プレハイブリダイズ: 7)と同じ操作

20) 第3回ハイブリダイズ: pR18の3' 断片 (工程4で得られるもの, 4.5×10^4 cpm/m²)、42 °C、15 時間

21) 洗い: 9)と同じ操作

22) 露光: 10)と同じ操作

制限酵素地図解析の結果を第11図に示す。

工程12 (pRGEプラスミドDNAの制限酵素解析)

pHGEプラスミドDNAのかわりにpRGEプラスミドDNAを用いる以外は工程11と実質的に同じ方法により工程10で得られるpRGEプラスミドDNAの制限酵素解析を行なう。得られるpRGE DNAインサートの制限酵素地図を第12図に示す。

工程13 (ウサギTNF遺伝子とヒトTNF遺伝子の塩基配列の決定)

工程9で得られる大腸菌K12JM83 (pHGE) 株と工程10で得られる大腸菌K12JM83 (pRGE) 株をpB2-7を有する大腸菌

K12MC1061株とpR18を有する大腸菌K12MC1061株の代わりに用いる以外は前記工程2と実質的に同じ操作を行なう。そして、それぞれ150 μ gのpRGEプラスミドDNAとpHGEプラスミドDNAを得る。

pRGEとpHGEの塩基配列はマキサム-ギルバート (Maxam-Gilbert) 法 (マキサム等 (Maxam et al.), メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 55巻 490頁 (1980年) アカデミック プレス (Academic Press)) によって決定する。

参考例2で決定したpR-18の塩基配列と、上で決定したpRGEの塩基配列を比較して、ウサギTNF遺伝子の構造 (エクソンとイントロンを含む) を解明する。pRGE DNAインサートの構造は第12図に示す。続いて、pRGEとpHGEの塩基配列を比較して、類似性とイントロン・エクソン境界付近の相同配列を調べる。このようにしてヒトTNF遺伝子の構造 (エクソンとイントロンを含む) を解明する。ヒトTNF遺伝

子の構造を第11図に示す。

このようにして得られるウサギTNFとヒトTNFをコードする塩基配列を下に示す。この塩基配列において、上の行はウサギTNFをコードする塩基配列(R)を、下の行はヒトTNFをコードする塩基配列(H)を示す。

(以下余白)

R TCA GCT TCT CGG GCC CTG AGT GAC AAG CCT
H TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT

R CTA GCC CAC GTA GTA GCA AAC CCG CAA GTG
H GTA GCC CAT GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT

R GAG GGC CAG CTC CAG TGG CTG AGC CAG CGT
H GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC CGG

R GCG AAC GCC CTG CTG CGC AAC GGC ATG AAG CTC
H GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG

R ACG GAC AAC CAG CTG GTG GTG CCG GCC GAC
H AGA GAT AAC CAG CTG GTG GTG CCA TCA GAG

R GGG CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTT CTC
H GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC

R TTC AGC GGT CAA GGC TGC CGC TCC ... TAC
H TTC AAG GGC CAA GGC TGC CGC TCC ACC CAT

R GTG CTC CTC ACT CAC ACT GTC AGC CGC TIC
H GTG CTC CTC ACC CAC ACC ATC AGC CGC ATC

R GCC GTC TCC TAC CCG AAC AAG GTC AAC CTC
H GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC

R CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAC CGG
H CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG

R GAG ACC CCC GAG GAG GCT GAG CCC ATG GCC
H GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC AAG CCC

R TGG TAC GAG CCC ATC TAC CTG GGC GGC GTC
H TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC

R TTC CAG TTG GAG AAG GGT GAC CGG CTC AGC
H TTC CAG CTG GAG AAG GGT GAC CGA CTC AGC

R ACC GAG GTC AAC CAG CCT GAG TAC CTG GAC
H GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC

R CTT GCC GAG TCC GGG CAG GTC TAC TTT GGG
H TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG

R ATC ATT GCC CTG
H ATC ATT GCC CTG

注) 記号"..."は、ウサギTNFをコードするDNAの塩基配列中にこの部分は存在しないことを意味し、従ってこの記号の両端に隣接する2つのコドンは直接つながっている。

工程14(オリゴデオキシヌクレオチドの合成)
コハク酸残基を介して2.0 μ Mのデオキシヌクレオシドが結合しているポリスチレン樹脂20 mgを、上下にステンレススチール製のフィルターのついた500 μ l容量の反応容器に装填する。樹脂は1 μ M臭化亜鉛ジクロルメタン-イソプロパノール溶液(85:15)で処理してジメトキシトリル(DMT)保護基を除き、ジクロルメ

タン-イソプロパノール(85:15)、次いでジメチルフォルムアミド、ピリジン、更にアセトニトリルで洗浄し、窒素気流で乾燥する。次いでDMT-ヌクレオチド(20 μ M)および、メチレンスルフォニルニトロトリアゾール(60 μ M)の乾燥ピリジン溶液200 μ lを加える。45°Cで20分間反応せしめた後、反応液を除去し、乾燥ピリジンで樹脂を洗浄後、ピリジン中の無水酢酸で未反応の残基を保護する。この、脱保護及び結合のサイクルを繰り返して、所望のオリゴデオキシヌクレオチドが樹脂上に合成される。次に樹脂をとり出し、オリゴヌクレオチドを樹脂から分離して、精製を行う。上記のオリゴデオキシヌクレオチドの合成および精製は伊東ら〔スク・スク・レス(Nuc.Ac. Res.), 10巻, 1755頁(1982)〕の方法に従って実施する。このようにして下記の如きオリゴデオキシヌクレオチドが得られる。

- 1) 5'-AATTCAATGTCATCTCTCGAACCCCGAGTGACAA-3'
- 2) 3'-GTACAGTAGAAGAGGCTTGGGGCTCACTGTTCGG-5'

3) 5'-GCCTGTAGCCCCATGTTGTAGCAAACCCCTCAAGC-3'
4) 3'-ACATCGGGTACAACATCGTTGGGAGTCGACT-5'

工程15(ヒトTNFのミニ遺伝子を含むM13mp9-HGEの調製)

プラスミドpHGE(10μg)をEcoRI(20単位)で消化し、1%の低融点アガロースゲル電気泳動の後、2.9kbのフラグメントを切出し溶出する。このフラグメントはM13mp9ファージの複製型のEcoRIフラグメント中へ挿入する。EcoRIフラグメントを挿入されたDNAはBRL社の手引書(ユーザーマニュアル(User Manual)／M13mp7クローニング(Cloning)／'ディオキシ'('Dideoxy')シーケンシング(Sequencing), 1980)に従い、大腸菌JM103を形質転換する。生成物をM13mp9-HGEと命名する。

工程16(M13mp9-HGE—重鎖DNAとデリータ-E3-4を用いるイントロン3の除去)

M13mp9-HGE—重鎖DNAはBRL社

却し、更に氷水中で冷却する。各0.4mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTPおよびATP溶液に対し、クレノーフラグメント(Klenow fragment)5単位、T4リガーゼ10単位を含むHin緩衝液(ウォレス(Wallace)ら、ヌク・アク・レス(Nuc.Ac.Res), 8巻3647頁(1981年))、即ち10mMトリス-塩酸(pH7.2)、2mM塩化マグネシウム及び1mMβ-メルカプトエタノールを含む液、を加える。反応混合物(最終容量50μl)は4℃で30分間及び室温で30分間、インキュベートする。オリゴスクレオチドをプライマーとして二重鎖合成されたDNAはBRL社の手引書(ユーザーマニュアル(User Manual)／M13mp7クローニング(Cloning)／'ディオキシ'('Dideoxy')シーケンシング(Sequencing), 1980)に従って、大腸菌JM103株に感染せしめる。このようにして得られるブラークは、YTプレート(ジェイ・エイチ・ミラー(J.H.Miller), エクスペリメンツ イン モレキュラージェネティクス(Experiments in Molecular Genetics)

の手引書(ユーザーマニュアル(User Manual)／M13mp7クローニング(Cloning)／'ディオキシ'('Dideoxy')シーケンシング(Sequencing), 1980)に従って調製される。

工程14で調製されたオリゴデオキシスクレオチド4)3'-ACATCGGGTACAACATCGTTGGGAGTCGACT-5'がイントロン3のデリータとして用いられる。イントロン3のデリータは"E3-4"と命名する。

デリータ-E3-4は、除去されるべきイントロン3の前方(即ちエクソン3)、及び後方(即ちエクソン4)に対し相補的な配列を有している。イントロン3の除去はウォレス(Wallace)らの方法(サイエンス(Science), 209巻1396頁(1980年))に従い、次の如く行う。

E3-4(164ng, 1.5pmole)は、T4リガーゼ(10単位)およびATP(3mM)を用いてリン酸化され、構型M13mp9-HGE(1.65μg, 0.5pmole)に加えられる。反応混合物は65℃、10分間加熱し、5分間室温に冷

netics), コールドスプリングハーバーラボラトリ(Cold Spring Harbor Laboratory)(1972年)433頁)に移す。得られるコロニーは、³²Pで標識されたE3-4と55℃2時間の条件下ハイブリダイズされる。イントロン除去工程の結果得られる各種生成物の内から、所望の配列を有するDNAを得るためのプローブとして、ここでは、デリータ-E3-4それ自身を利用する。かくしてデリータ-E3-4とハイブリダイズするコロニーを得、更にファージを取得する。

得られるファージをプレートにまき、得られるブラークをYTプレートに移す。ここで再び³²Pで放射ラベルしたE3-4と55℃2時間の条件下ハイブリダイズせしめる。強くハイブリダイズするクローニングから、ファージDNAを取得し、塩基配列を解析し、イントロン3が完全に除去されているファージを選別する。このようなファージの1つをmp9-HGEΔ3-1と命名する。

工程17(pHTNF-2acUV5-2の構築)

p 9 - HGEΔ3-1 の複製型を EcoRI で消化し、電気泳動により単離する。この断片を EcoRI で切断した pBR327 に挿入し、プラスミド pHGEΔ3-1 を得る。

次にプラスミド pHGEΔ3-1 を用い、lac UV5 をプロモーターとして TNF を大腸菌中で、直接発現させることのできるプラスミドを構築する。この構築方法は第14図に示される。

まず $10\ \mu\text{g}$ のプラスミド pHGEΔ3-1 を 10 単位の AvaI と EcoRI (BRL社、米国) で 37°C 2時間消化し、4重量%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により目的フラグメントを単離する。約 $1\ \mu\text{g}$ の断片が電気泳動溶出によりゲルから回収される。工程14と同じように第14図に示される2種のオリゴデオキシヌクレオチド即ち $5' - \text{AATTCAATGTCATCTTCTCGAACCC-3'}$ 及び $5' - \text{TCG GGGTTTCGAGAAGATGACATG-3'}$ を合成する。次いで文献(3)122頁の方法に従いこの2本のオリゴヌクレオチド(約 $100\ \mu\text{mole}$)の5'端を T、ボリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化する。

これらの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、EcoRI で消化し、目的の EcoRI 断片を有するプラスミドを同定する。更にDNAの挿入の方向を調べるためにこれらのプラスミドを PvuII と PstI 消化して1.5重量%アガロースゲル電気泳動を行った結果約 $1280\ \text{bp}$ 及び約 $2600\ \text{bp}$ の断片を有し、lac UV5 プロモーターの下流に正しく TNF をコードするDNAが接続されているプラスミドを選別する。

塩基配列を決定すると、2個のプラスミドは同じ塩基配列を有し、合成オリゴヌクレオチド及び染色体由来のcDNAが正しく接続されていることが示される。得られるプラスミドを pHTNF-lacUV5-2 と命名する。

pHTNF-lacUV5-2 を含有する大腸菌を、通常の栄養培地で培養する。生成物の TNF 活性を測定すると、lac プロモーターによって制御されるウサギ TNF 遺伝子を有する pTNF-lacUV5-1 を含有する大腸菌の生産物とほとんど同様の活性を示す。

反応後、フエノールで沈いでクロロホルムで抽出する。かくして得られる合成オリゴマーと、上記で得られる pHGEΔ3-1 の AvaI - EcoRI 断片 $0.5\ \mu\text{g}$ を混合し、エタノール沈澱した後、文献(1)37頁の方法に従って10単位の T、リガーゼを用い 4°C 一夜で結合せしめる。反応終了後、混合物はエタノール沈澱し、4重量%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により目的断片を単離する。

プラスミド pOP95-15 はエフ・フラー(F. Fuller)の方法(ジーン(Gene)19巻、42-54頁(1982年))により調製する。

pOP95-15 の $1\ \mu\text{g}$ を EcoRI で消化してフエノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈澱をして調製したベクター $0.5\ \mu\text{g}$ と、上記の如く得た断片を、T、DNAリガーゼを用いて結合する。文献書(4)、20頁に従って、得られるベクターで大腸菌 JM101 株(ATCC33876)を形質転換して 1mM IPTG 及び $0.004\%(\text{v/v})\ \text{x-gal}$ を含む寒天培地上に約100個の白色コロニーを得る。

参考例4

参考例3における工程1から14に従って調製されるプラスミド pHGE とオリゴヌクレオチド1) - 4) を用いて、pHTNF-lacUV5-1 を調製する。その調製方法を第13図に示す。

参考例5

1) 抗原の精製

参考例4で得られる遺伝子組換体 pHTNF-lacUV5-1 を含有する大腸菌を、通常の方法で培養する。次いで目的とする生理活性物質が生産されるよう 1mM IPTG を加えて誘導操作を行ない、さらに培養を行なって該生理活性物質を含有する大腸菌を得る。遠心分離により菌体を集め、該菌体を 0.04M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.8) 1L 中で超音波破碎し該生理活性物質を含む菌体抽出液を得る。

この培液は、 $4.5 \times 10^5\text{U/mg}$ の活性を示し、比活性は $3.0 \times 10^6\text{U/mg}$ であった。

次いで該抽出液を、 0.04M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で十分平衡化したDEAE-セファロース

CL-6B(ファルマシア社、スウェーデン)のカラムに添加する。0.04Mトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で洗浄後、0.1M塩化ナトリウムを含む0.04Mトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)を用いて溶出する。活性画分を限外ろ過により濃縮して、比活性 $4.0 \times 10^5 \text{U}/\text{mg}$ の粗精製溶液を得る。

この粗精製溶液を、0.15M塩化ナトリウムを含む5 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)で平衡化したセファクリルS-200(ファルマシア社、スウェーデン)のカラムに添加し、同緩衝液にてゲルろ過をおこなう。活性画分を限外ろ過により濃縮して濃度 $2.0 \times 10^5 \text{U}/\text{ml}$ 、比活性 $7.5 \times 10^5 \text{U}/\text{mg}$ の精製溶液を得る。

2) マウスの免疫

上で得られた精製溶液と、フロイント・コンブリート・アジュvantを同量混合・乳化させ、BALB/cマウスの雄の皮下に2週間の間隔をあけて3回にわけて1回当たり0.2 mlを投与し、免疫を行なう。さらに4週間後、同マウスの腹腔内に該精製溶液0.5 mlを投与し、最終免疫を行なう。

ブテリン $4 \times 10^{-7} \text{M}$ 、チリジン $1.6 \times 10^{-8} \text{M}$ を含んだRPMI1640-10%FCS培地(HAT培地)を各ウェルに0.1 mlずつ添加する。その後3~4日毎に半分量をHAT培地で交換すると、7日目からいくつかのウェルでハイブリドーマ細胞の生育が認められ、2~3週間後にはほぼ全ウェルでハイブリドーマ細胞が増殖する。

4) 抗体産生細胞の検索とクローニング

ハイブリドーマ細胞の生育してきたウェルの培養上清0.1 mlを、該生理活性物質が固定されている96穴マイクロプレートのウェル内に入れ、室温で1時間静置する。0.1%のウシ血清アルブミンを含む生理食塩水で洗浄後、ペルオキシダーゼで標識された抗マウスIgG(カッペル社、米国)の10000倍希釈液を0.1 ml/ウェル加え、室温で1時間静置する。0.1%ウシ血清アルブミンを含む生理食塩水で洗浄後、基質液(30 mg o-フェニレンジアミン、7 μl過酸化水素水、1.0 ml 0.1 Mクエン酸、1.0 ml 0.2 Mリン酸水素二ナトリウム)を0.15 ml/ウェル加える。

3) 細胞融合

最終免疫の3日後に同マウスを殺し、脾臓を取り出す。これを細断した後ステンレスメッシュで圧迫・押過し、イーグルのミニマム・エッセンシャル培地(MEM)に浮遊させ、脾細胞浮遊液を得る。この脾細胞とマウスミエローマ細胞(P₃/X63-Ag8 UI)をそれぞれMEMで3回洗浄し、脾細胞とミエローマ細胞を4:1で混合して遠心(800 rpm, 15分)する。得られる沈殿に44%ポリエチレングリコール2000/MEM溶液2 mlを徐々に加え、37°C温水中で1分間遠心管をゆっくり回転させて細胞融合を行なう。次いでMEM 1 mlを加えてゆっくり回転させ、さらに毎分2 mlの割合でMEMを添加し計10 mlとした後遠心(500 rpm, 5分)する。沈殿を、10%ウシ胎児血清(FCS)含有ロズウェル・パーク・メモリアル・インスティテュート(RPMI)1640培地にミエローマ細胞として 7×10^5 個/mlになるように懸濁し、96穴マイクロプレートに1ウェルあたり0.1 ml植えつける。

1日後、HAT(ヒポキサンチン $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、アミノ

3.0分後482nmの吸光度を測定し、抗体産生細胞の存在するウェルを検索する。

強い抗体活性を示すウェル中の各クローンを、ガラス細管を用いて吸い出してクローニングを行なう。各クローンにつき、上記の方法で抗体活性を再検索して、強い抗体活性を示すHybrid Cell Line HIV3Fのクローンを得る。

これらの細胞は、10%FCS含有RPMI-1640培地を用いて培養を拡大し、細胞を集め、15%FCS及び10%ジメチルスルホキシドを含有するRPMI-1640培地中で液体チップ内に貯蔵する。

5) ハイブリドーマ細胞の腹水化

上で得られるハイブリドーマ細胞 1×10^7 個を、あらかじめ0.2 mlのブリストン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)を腹腔内に投与しておいたBALB/cマウスの腹腔内に接種することにより腹水化を行なう。10日後3~5 ml/匹の腹水を採取する。

6) モノクローナル抗体の精製

上記腹水の1.0 mlに硫酸アンモニウムを2.66

g 加え(35%飽和)、4℃で一晩攪拌する。生じる沈殿を遠心分離し、0.01Mリン酸緩衝液(pH8.0)で平衡化しておいたDEAE-セファロースCL-6B(ファルマシア社、スウェーデン)のカラムに添加し、同緩衝液で洗浄した後、0.2M NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH8.0)で溶出する。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりモノクローナル抗体画分を決定し、最終的にHV3Fモノクローナル抗体148ngを得る。

7) モノクローナル抗体のサブクラス決定

オクタロニー免疫拡散法(その方法はたとえばハドソン(Hudson)ら著“Practical Immunology”, Blackwell Scientific Publications)(1976)107-115頁に記載してある)にて、抗マウスIgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}(いずれもマイルズ(Miles)社、米国)を用い、サブクラスを決定する。その結果HV3Fモノクローナル抗体はIgG₁である。

8) モノクローナル抗体による該生理活性物質

社、スウェーデン)を用いて、アウデー(Audeh)らの方法[ネイチャー(Nature), 219(1980)66]に従って実施する。

その結果、HV3Fモノクローナル抗体の等電点は、6.4～6.7である。

(以下余白)

の活性の消去

1)で得られる該生理活性物質の精製溶液を10%FCS含有HEM培地で20U/mlおよび200U/mlに希釈した。6)で得られるモノクローナル抗体も同培地で各濃度に希釈する。両液を1ウェルあたり0.05mlずつ96穴マイクロプレートに加える。37℃で1時間置いて、10⁴個/mlのL-M細胞の同培地懸濁液を0.1ml加える。その後の操作は参考例1に記載したL細胞障害活性測定法に準ずる。同時に該生理活性物質もモノクローナル抗体も加えない実験(A)とモノクローナル抗体のみを加えない実験(B)も行なう。

その結果HV3Fモノクローナル抗体はINFの活性を消去しない活性非消去型のモノクローナル抗体であることがわかる。

9) モノクローナル抗体の等電点測定

薄層ゲル等電点電気泳動装置(ファルマシア社、スウェーデン)を用い、該モノクローナル抗体の等電点を測定する。キャリヤー・アンフォライトとしてファルマライトpH3～10(ファルマシア

参考例6 (ヒトTNFの¹²⁵I標識)

参考例3で得られるヒトTNF(5.87×10⁷U/2.5mg/ml)60μlと0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH8.4)20μlを氷冷下に混合したものを、あらかじめ窒素気流下に溶媒を蒸発させたボルトン-ハンター試験(アマーシヤム社、英国、4,000ci/mmol)5uciの入った容器に注入して、室温で2時間反応させ、1Mグリシンを1.0μl加えて反応を停止させる。この反応液を、あらかじめ5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したセファデックスG-25(ファルマシア社、スウェーデン)(8ml、直徑1.0cm×高さ10cm)に添付して脱塩を行ない、¹²⁵I標識ヒトTNF画分1mlを得る。参考例1に記載の方法によるL細胞障害活性の測定および放射活性の測定により標識体の比活性を得る。得られる標識体の比活性は140Ci/mmolである。

参考例7 (ヒトTNF固定化セファロースの作製)

トレシル活性化セファロース4B (Tresyl act

ivated Sepharose 4B) (ファルマシア社製, スウェーデン) 5 g を 1 mM の HCl に懸濁させると約 20 mL に膨潤する。これをガラスフィルター上に移しアスピレーターで吸引しながら 1 mM HCl 1 L で充分に洗浄する。次に 0.1M NaHCO₃, -0.5M NaCl, pH 8.0 (カップリングバッファー) 200 mL で洗浄する。このゲルを 50 mL の遠心チューブに移し、2.5 mg/mL の TNF を含むカップリングバッファー 20 mL を加え、4°C 16 時間、暖かに振とうして反応させる。

反応終了後、この懸濁液をガラスフィルターで押過し、さらに、20 mL のカップリングバッファーで洗浄した沪液を集め。集めた沪液は TNF 濃度が 0.3 ng/mL である。この沪液は約 2 倍に希釈されているので、遊離の TNF から計算したカップリング効率は 75% である。一方、ゲルを再び遠心チューブに移し、1M エタノールアミン-塩酸 pH 9.0 に懸濁して 4°C で 4 時間緩やかに振とうして未反応の解離基を反応させる。その後、再びガラスフィルター上に移して、0.1M NaHCO₃-Na₂CO₃, pH

8.5 50 mL 及び 0.1M 塩酸バッファー pH 4.0 50 mL で交互に洗浄を 3 回繰り返した。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、pH を中性に戻して使用する。

参考例 8

(免疫染色法による L-M 細胞と L-R 細胞の受容タンパク量の定性的比較)

L-M 細胞 (ATCC CCL1.2) と L-R 細胞 (50 万 U TNF に耐性の L-M 細胞由来の細胞株) をそれぞれ 4×10^6 個/mL 含む細胞浮遊液 1 mL をあらかじめカバーガラスを入れた 12 穴のマルチディッシュ内のウエルに入れ、一晩培養し、L-M 細胞と L-R 細胞の標本を得る。尚、L-R 細胞は次のようにして得られる。まず L-M 細胞を最初は TNF 1 U 含む培地で 3 日間培養する。培養後生存する細胞を培地中の TNF 量を約 2 倍ずつ増やしながら 3 日間隔で継代培養する。このようにして 50 万 U の TNF に耐性を有する L-R 細胞が得られる。L-R 細胞は 50 万 U TNF に耐性である以外は形状、性質等は L-M 細胞と変わらない細胞株である。得られた標本、参考例

3 で得られる生理活性物質 (ヒト TNF), 参考例 5 で得られる該生理活性物質に対する活性非消去型のモノクローナル抗体 HV3F, および、オーソミューン染色用キット (オーソ・ダイアグノスティック・システムズ株式会社) 中の第一次抗体を除く試薬を用いて、オーソミューン染色用キットの手順に準じて該生理活性物質の受容タンパクの免疫染色を行なう。すなわち、上記細胞の標本をデシケーター中で充分乾燥し、アセトンで 10 分間固定し、室温で 5 分間乾燥した後、リン酸緩衝液に 10 分間浸す。次に非特異的反応をあらかじめ阻止するために上記染色用キットのブロッキング試薬 (正常ヤギ血清) で 20 分間処理した後、該生理活性物質 2×10^4 U/mL, 200 μL を滴下して室温で 20 分間処理する。更に、該生理活性物質に対する活性非消去型のマウスモノクローナル IgG 抗体 HV3F (40% 稲安沈殿後、リン酸緩衝液で透析した部分精製品、約 8 mg タンパク質/mL) をキットの第一次抗体の代わりに用いて 20 分間反応させる。以下、キットの操作手引書の手順に従い、ヘマトキシリンによる対比染色を施した後、ゼラチンで封入して顕微鏡観察を行なう。尚、該生理活性物質のかわりに 0.1% ゼラチン含有リン酸緩衝液を用いる対照の染色標本を作成し、非特異的な染色の程度を調べる。その結果を第 1 図に示す。L-M 細胞を該生理活性物質で処理したもの (第 1 図 (a)) は、対照 (第 1 図 (b)) に比して明らかに濃く染色される。これに対し L-R 細胞では該生理活性物質で処理したもの (第 1 図 (c)) と対照 (第 1 図 (d)) とで染色度に差は認められず、その染色度は L-M 細胞の対照と同程度である。これらの結果より、該生理活性物質に対する受容タンパクが L-M 細胞に多く存在し、

従う。すなわち、キットの第二次抗体 (ヤギ抗マウス免疫グロブリン) を 20 分間反応させ、次いでキットの標識抗体 (ペルオキシダーゼ標識マウス免疫グロブリン) を 20 分間反応させる。最後にキットの AEC 基質 (3-アミノ-9-エチルカルバゾール) を加えて 20 分間反応させて免疫染色工程を終了する。次に、キットの操作手引書の手順に従い、ヘマトキシリンによる対比染色を施した後、ゼラチンで封入して顕微鏡観察を行なう。尚、該生理活性物質のかわりに 0.1% ゼラチン含有リン酸緩衝液を用いる対照の染色標本を作成し、非特異的な染色の程度を調べる。その結果を第 1 図に示す。L-M 細胞を該生理活性物質で処理したもの (第 1 図 (a)) は、対照 (第 1 図 (b)) に比して明らかに濃く染色される。これに対し L-R 細胞では該生理活性物質で処理したもの (第 1 図 (c)) と対照 (第 1 図 (d)) とで染色度に差は認められず、その染色度は L-M 細胞の対照と同程度である。これらの結果より、該生理活性物質に対する受容タンパクが L-M 細胞に多く存在し、

L-R細胞にはほとんど存在しないことがわかる。

またヒト胎児肺由来正常2倍体細胞(マイクロバイオロジカル アソシエーツ社,米国)を用いる以外は上記と同様の方法で免疫染色を行なう。該ヒト胎児由来正常2倍体細胞にはL-R細胞と同様核生理活性物質に対する受容タンパクは認められない。

参考例9

(ヒトTNFによるL-M細胞受容タンパクの確認)

5×10^7 個のL-M細胞を細胞洗浄液(0.05Mホウ酸、0.15M塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム及び1mM塩化カルシウムからなる溶液を1M水酸化ナトリウムでpH 7.2に調整したもの)40mLに懸濁し、450g、5分間、4°Cで遠心分離することにより洗浄した後、抽出溶液[0.02Mホウ酸、0.2mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸塩)からなる溶液を1M水酸化ナトリウムでpH 10.2に調整したもの]20mLに懸濁する。これを-20°Cで凍結した後、37°Cで融解すること(凍結融解)を3回繰り返し、更にウルトラソニック社(米国)のW-225R型

超音波破碎器で40-50ワットで1分間超音波処理する。これに0.5Mホウ酸水溶液160mLを加えてよく搅拌した後、2枚重ねのナイロンガーゼで沪過して大きな細胞塊を除去する。この沪液を2°C、450gで10分間遠心分離して得られる上清をさらに2°Cで12,000g 30分間遠心分離する。その沈渣をリン酸緩衝液2.5mLに懸濁した後、35%ショ糖を含むリン酸緩衝液3mLの上に重層して、2°Cで24,000g、1時間遠心分離する。その重層界面に濃縮される膜画分をリン酸緩衝液800μLに懸濁した後、100,000g、10分間2°Cで超遠心する。得られる沈渣は約5μLである。これに10%トリトンX-100水溶液0.5μLを加え、室温に15分間放置した後リン酸緩衝液(200mM ヘペス緩衝液(pH 7.4)、0.6%塩化ナトリウム、10%ウシ胎児血清、30mM 塩化マンガンからなるもの)4μLを加える。これに参考例3で得られるヒトTNF(2×10^8 U/mL)または0.1%ゼラチンを含有するリン酸緩衝液を25μLを加え、さらに γ -³²P-アデノシントリリン酸(アマーシャム社製、 $>5,000$ Ci/mmol)

を 10μ Ci加えた後、氷上で5分間反応させる。これをリン酸緩衝液500μLで2回洗浄(12.000g、2分間、室温で遠心分離)して、その沈渣にSDSサンプル溶液(1% SDSおよび40%シミ糖水溶液からなるもの)4.0μLを加えて、5分間煮沸した後、ポリアクリルアミド10%を含むSDS-ポリアクリルアミド平板ゲル電気泳動を行なう。ゲルを乾燥し、コダックX-OmatARフィルム(イーストマン、コダック社、米国)を用いてオートラジオグラフィーを行なう。結果を第2図に示す。第2図において(a)はヒトTNFを添加しないものの結果を示し、(b)はヒトTNFを添加したものの結果を示す。第2図に示されるように分子量9.5万の位置にバンドが認められる。これより分子量9.5万の受容タンパクがヒトTNFによりリン酸化されることがわかる。

参考例10 [クロスリンク(Cross-link)法によるL-M細胞、MJ-841細胞由来受容タンパクの分子量測定]

1×10^7 個のL-M細胞とMJ-841細胞を

それぞれ細胞洗浄溶液(0.05Mホウ酸、0.15M塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム、1mM塩化カルシウムからなる溶液を1M水酸化ナトリウムでpH 7.2に調整したもの)40mLに懸濁し、4°C、450gで5分間遠心分離することにより洗浄し、抽出溶液[0.02Mホウ酸、0.2mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸塩)からなる溶液を1M水酸化ナトリウムでpH 10.2に調整したもの]20mLに懸濁する。これを-20°Cで凍結し、37°Cで融解すること(凍結融解)を3回繰り返し、更にウルトラソニック社(米国)のW-225R型超音波破碎器で40-50ワットで1分間超音波処理する。これに0.5Mホウ酸水溶液160mLを加えてよく搅拌した後、2枚重ねのナイロンガーゼで沪過して大きな細胞塊を除去する。この沪液を2°C、450gで10分間遠心分離して得られる上清をさらに2°Cで12,000g 30分間遠心分離する。その沈渣をリン酸緩衝液2.5mLに懸濁した後、35%ショ糖を含むリン酸緩衝液3mLの上に重層して、2°Cで24,000g、1時間遠心分離する。その重層界

面に濃縮された膜面分をリン酸緩衝液 800 μ l に懸濁し、2℃、100,000 g で 10 分間超遠心する。得られる沈渣は L-M 細胞、M J - 841 細胞とともに、約 10 μ l である。これに 10% トリトン (Triton) X-100 水溶液 1 μ l を加え、室温に 15 分間放置した後、参考例 6 で得られる 125 I 標識ヒト TNF (140 Ci/mmol, 1.4 mCi/ml) を 50 μ l 加えて 4℃で 1 時間静置する。これに 0.1% ウシ胎児血清を含むリン酸緩衝液 500 μ l を加えて、12,000 g、2 分間、室温で遠心して洗浄する操作を 3 回行ない、沈渣に 1 mM ジサクシニミジルスルペート (DSS) 溶液 (DSS をジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した 1.0 M 溶液をリン酸緩衝液で 100 倍に希釈したもの) 200 μ l を加えて、室温で 15 分間反応させる。これをリン酸緩衝液 500 μ l で 2 回洗浄 (12,500 g、2 分間、室温で遠心分離) して、その沈渣に SDS サンプル溶液 (1% SDS および 4% シュ糖水溶液からなるもの) 40 μ l を加えて、5 分間煮沸した後、ポリアクリルアミド 1.0

0% のウシ胎児血清を含む DM - 160 AU 培地 (極東製薬(株)社製、日本) 1 ml 中にそれぞれ懸濁して 4℃で 1 時間静置した後、細胞をバインディング用培地 (0.1% ウシ血清アルブミン含有イーグルのミニマム・エッセンシャル培地) で 3 回洗浄する。洗浄細胞にバインディング用培地 400 μ l を加えた後、参考例 6 で得られた 125 I 標識ヒト TNF (140 Ci/mmol) を含む 0.1% ゼラチン含有リン酸緩衝生理食塩水 50 μ l およびバインディング用培地もしくは参考例 3 で得られた非標識ヒト TNF を含む 0.1% ゼラチン含有リン酸緩衝生理食塩水を 50 μ l 加えて更に 4℃で 1 時間静置する。これを 1% ウシ胎児血清含有イーグルのミニマム・エッセンシャル培地で 3 回洗浄した後、0.5% の NaOH を 400 μ l 加えて 37℃で 30 分間放置することにより細胞を溶解させ、その中に含有される 125 I の放射汚性を γ -カウンターを用いて測定する。用いられる 125 I 標識体は最終濃度が 5 nM 以下になるように濃度を変えて加え、非特異的バインディングを調べるために添加

% を含む SDS - ポリアクリルアミド平板ゲル電気泳動を行なう。ゲルを乾燥した後、コダック X - OnatAR フィルム (イーストマン・コダック社、米国) を用いてオートラジオグラフィーを行なう。L-M 細胞についてその結果を第 3 図に示す。第 3 図より明らかのように分子量 3.5 万のヒト TNF のバンドの他にヒト TNF と受容タンパクが架橋された複合体のバンドが、分子量 1.3 万に認められる。この結果より該受容タンパクの分子量は 9.5 万であることが示唆され、参考例 2 の結果との一致から分子量 9.5 万が確認される。M J - 841 細胞についても L-M 細胞と同様の結果が得られる。

参考例 1.1 [125 I 標識ヒト TNF を用いるバインディング アッセイ (Binding Assay)]

L-M 細胞及び M J - 841 細胞 (NCACC 85061801) をそれぞれ 5×10^5 個を、L-M 細胞は 1.0 v/v% のウシ胎児血清を含むイーグルのミニマム・エッセンシャル培地 (フロー・ラボラトリ - 社製、米国) 1 ml 中に、M J - 841 細胞は 20

した非標識体は最終濃度が 1 μ M になるように加える。培地に加えたヒト TNF の濃度と細胞に結合したヒト TNF の量との関係を第 4 図 (L-M 細胞) および第 6 図 (M J - 841 細胞) にグラフにして示す。これらの結果から特異的結合についてスキャッチャード・プロット (Scatchard plot) 解析 [スキャッチャード、ジー。 (Scatchard, G.)、 アニュアル ニューヨーク アカデミー オブサイエンス (Annual New York Academy of Science) 51巻 660~672 頁 1949 年] した結果を第 5 図 (L-M 細胞) および第 7 図 (M J - 841 細胞) にグラフにして示す。これらのグラフで表される勾配と切片から、L-M 細胞の受容タンパク数は $4.06 \times 10^4 / \text{cell}$ で、解離定数は $1.56 \times 10^{-10} \text{ M}$ である。一方、M J - 841 細胞の受容タンパク数は $6.20 \times 10^4 / \text{cell}$ で、解離定数は $1.61 \times 10^{-10} \text{ M}$ である。

(以下余白)

実施例 1

工程 1 (TNF の受容タンパクを含有する膜画分の抽出)

ディスボーサブル セル スクレイパー [コスター (Costar[®]) (コスター社、米国)]を用いてシャーレからはがしたL-M細胞 3×10^6 個を細胞洗浄液 (0.05M ホウ酸、0.15M 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウムおよび1mM 塩化カルシウムからなる溶液を1M水酸化ナトリウムでpH 7.2に調製したもの) 40mLに懸濁し4°Cで、450g、5分間、遠心分離することにより洗浄した後、抽出溶液 [0.02M ホウ酸、0.2mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸塩) からなる溶液を1M水酸化ナトリウムでpH 10.2に調製したもの] 20mLに懸濁する。これを-20°Cで凍結し、37°Cで融解すること (凍結融解) を3回繰返し、更にウルトラソニック (米国) のW-225R型超音波破碎器で40~50ワット1分間超音波処理する。これに0.5M ホウ酸水溶液 160mLを加えてよく攪拌し、

0mLを分取する。これを通常の方法によりポローファイバー膜 (分子量カット6000) で40mLにまで濃縮する。

工程 3 (アフィニティーコロマトグラフィー)

工程 2で得られるサンプルをあらかじめ上記緩衝液で平衡化したTNF結合セファロースCL-6Bカラム (TNF 3mg/mL ゲル結合) (4mL、直径0.9cm × 高さ6.3cm) に添加し、20倍量の同緩衝液で洗浄した後、TNF 100U/mLを同緩衝液で溶出する (溶出画分8mL)。

工程 4 (ゲル通過)

前記精製工程で得られる溶出液を、あらかじめ3M KCl、0.5%n-オクチル-β-ドーグリコシドを含む10mMリン酸緩衝液 (pH 7.2) で平衡化したセファクリルS-200 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (160mL、直径1.5cm × 高さ90cm) に添加した後、同緩衝液で溶出し、分子量8万から11万の画分10mLを分取する。次いでこの画分をセントリコン (アミコン社、米国、分子量1万カット) で濃縮

2枚重ねのナイロンガーゼで汎過して大きな細胞塊を除去する。この汎過を2°C、450gで10分間遠心分離して得られる上清をさらに2°Cで、12,000g 30分間遠心分離する。その沈渣をリン酸緩衝液 2.5mLに懸濁した後、35%ショ糖を含むリン酸緩衝液 3mLの上に重層して、2°Cで24,000g、1時間遠心分離する。その重層界面に濃縮される膜画分をリン酸緩衝液 800μLに懸濁し、2°Cで100,000g、10分間超遠心する。得られる沈渣は60μLである。

工程 2 (ゲル汎過)

工程 1で得られる膜画分 20mLを200mLの1%n-オクチル-β-ドーグリコシドで可溶化したものを、あらかじめ0.15M 塩化ナトリウム、0.5%n-オクチル-β-ドーグリコシドを含む10mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したセファクリルS-200 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (7000mL、直径10cm × 高さ80cm) に添加した後、同緩衝液で溶出し、分子量8万から11万の画分40

して1mLとし、これをあらかじめ0.15M NaCl、0.5%n-オクチル-β-ドーグリコシドを含む10mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したセファデックスG-25 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (6.4mL、直径0.9cm × 高さ10cm) に添加し、脱塩を行ない、1.5mLの精製画分を得る。この精製画分の200μLに、0.1%ウシ胎児アルブミンを含むクレブスリソゲル重炭酸緩衝液 1.58g および、参考例6で得られる¹²⁵I標識ヒトTNF (140Ci/mmol, 1.4mCi/mL) を20μLを加えた試験管を2本用意する。その中の1本に非標識のヒトTNF (50μM) 200μLを加え、他の1本にリン酸緩衝液を200μL加えて、それぞれよく混合し、24°Cで30分間静置する。次いで得られる混合液それぞれに、あらかじめ氷冷しておいた0.1%ウシーグロブリンを含む0.1リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 2mLを加え、さらに、あらかじめ氷冷しておいた2.5%ポリエチレン glycolを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液

(pH 7.4) 2 ml を加えて、十分に搅拌し、15分間氷冷する。これらをそれぞれセルロースアセテート (EH) ミリポアフィルターで通過した後、8% ポリエチレングリコールを含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 30 ml で洗浄し、各々のフィルターに保持された¹²⁵I の放射活性をオートカウンターで測定する。その結果、非標識ヒトTNF を添加する場合の非特異な結合によるカウントが 1250 dpm であるのに対し、非標識ヒトTNF を添加しない場合のカウントは 10,500 dpm であり、得られる精製画分のヒトTNF に対する特異結合能が確認される。

実施例 2

工程 1 (TNF の受容タンパクを含有する膜画分の抽出)

ビベッティングでシャーレから回収した MJ-841 細胞 1×10^9 個を細胞洗浄液 (0.05M ホウ酸、0.15M 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム および 1mM 塩化カルシウムからなる溶液を 1M 水酸化ナトリウムで pH 7.2 にしたも

の) 40 ml に懸濁し 4°C で、450 g、5 分間、遠心分離することにより洗浄した後、抽出溶液 (0.02M ホウ酸、0.2mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸塩) からなる溶液を 1M 水酸化ナトリウムで pH 10.2 に調整したもの) 20 ml に懸濁する。これを -20°C で凍結し 37°C で融解すること (凍結融解) を 3 回繰返し、更にウルトラソニック社 (米国) の W-225R 型超音波破碎器で 40 ~ 50 ワット 1 分間超音波処理する。これに 0.5M ホウ酸水溶液 160 ml を加えよく搅拌し、2 枚重ねのナイロンガーゼで通過して大きな細胞塊を除去する。この溶液を 2°C、450 g で 10 分間遠心分離して得られる上清をさらに 2°C で、12,000 g 30 分間遠心分離する。その沈渣をリン酸緩衝液 2.5 ml に懸濁した後、35% ショ糖を含むリン酸緩衝液 3 ml の上に重層して、2°C で 24,000 g、1 時間遠心分離する。その重層界面に濃縮される膜画分をリン酸緩衝液 800 μl に懸濁し、2°C で 100,000 g、10 分間超遠心する。得られる沈渣は約 200 μl である。

工程 2 (ゲル通過)

工程 1 で得られる膜画分 20 ml を 200 ml の 1% n-オクチル-β-D-グリコシドで可溶化したものを、あらかじめ 0.15M 塩化ナトリウム、0.5% n-オクチル-β-D-グリコシドを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したセファクリル S-200 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (7000 ml、直徑 10 cm × 高さ 90 cm) に添加した後、同緩衝液で溶出し、分子量 8 万から 11 万の画分 400 ml を分取する。これを通常の方法によりホローファイバー膜 (分子量カット 6000) で 40 ml にまで濃縮する。

工程 3 (アフィニティクロマトグラフィー)

工程 2 で得られるサンプルをあらかじめ上記緩衝液で平衡化した TNF 結合セファロース CL-6B カラム (TNF 3 μg/ml ゲル結合) (4 ml、直徑 0.9 cm × 高さ 6.3 cm) に添加し、20 倍量

の同緩衝液で洗浄した後、TNF 100 U/ml を同緩衝液で溶出する (溶出画分 6 ml)。

工程 4 (ゲル通過)

前記精製工程で得られる溶出液を、あらかじめ 3M KCl、0.5% n-オクチル-β-D-グリコシドを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で平衡化したセファクリル S-200 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (160 ml、直徑 1.5 cm × 高さ 90 cm) に添加した後、同緩衝液で溶出し、分子量 8 万から 11 万の画分 10 ml を分取する。次いでこの画分をセントリコン (アミコン社、米国分子量 1 万カット) で濃縮して 1 ml とし、これをあらかじめ 0.15M NaCl、0.5% n-オクチル-β-D-グリコシドを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したセファデックス G-25 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (6.4 ml、直徑 0.9 cm × 高さ 10 cm) に添加し、脱塩を行ない、1.5 ml の精製画分を得る。この精製画分の 200 μl に、0.1% ウシ胎児アルブミンを含むクレブスーリン

ゲル重炭酸緩衝液1.58 ml および、参考例6で得られる¹²⁵I標識ヒトTNF (140Ci/mmol, 1.4nCi/ml)を20 μlを加えた試験管を2本用意する。その中の1本に非標識のヒトTNF (50 μM) 200 μlを加え、他の1本にリン酸緩衝液を200 μlを加えて、それぞれよく混合し、24°Cで30分間静置する。次いで得られる混合液それぞれに、あらかじめ氷冷しておいた0.1%ウシーグロブリンを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 2 mlを加え、さらに、あらかじめ氷冷しておいた25%ポリエチレングリコールを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 2 mlを加えて、十分に攪拌し、15分間氷冷する。これらをそれぞれセルロースアセテート (EH) ミリポアフィルターで通過した後8%ポリエチレングリコールを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 30 mlで洗浄し各々のフィルターに保持された¹²⁵Iの放射活性をオートラジオカウンターで測定する。その結果、非標識ヒトTNFを添加する場合の非特異的な結合によるカウントが98

0dpmであるのに対し、非標識ヒトTNFを添加しない場合のカウントは11,050dpmであり、得られる精製画分のヒトTNFに対する特異結合能が確認される。

4. 図面の簡単な説明

第1図はL-M細胞のTNF存在下(a)及び非存在下(対照)(b)、及びL-R細胞のTNF存在下(c)及び非存在下(対照)(d)における免疫染色の結果を示す光学顕微鏡写真(×300)を示す。第2図はL-M細胞受容タンパクをヒトTNF非存在下(対照)(a)及びヒトTNF存在下(b)にリン酸化したもののオートラジオグラフを示す。第3図はL-M細胞受容タンパクとヒトTNFの架橋複合体のオートラジオグラフを示す。第4図はL-M細胞を含む培地に加えたヒトTNF濃度とL-M細胞受容タンパクに結合したヒトTNF量との関係を示すグラフである。第5図は第4図において示されるヒトTNFとL-M細胞受容タンパクとの特異的結合についてのスキヤッチャード

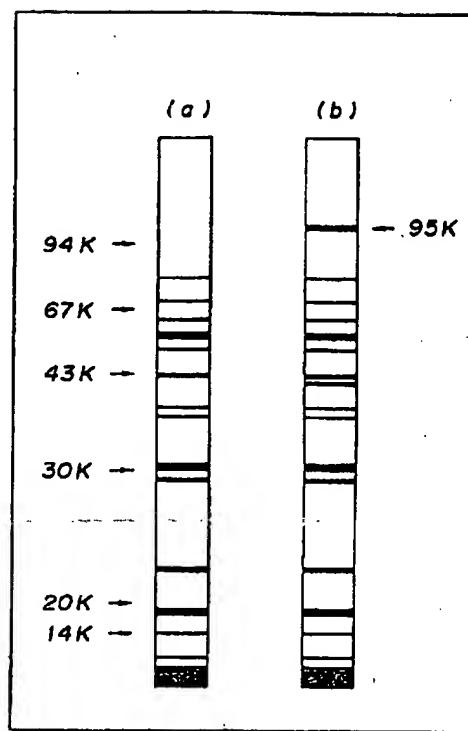
プロット解析結果を示すグラフである。第6図はMJ-841細胞を含む培地に加えたヒトTNF濃度とMJ-841細胞受容タンパクに結合したヒトTNF量との関係を示すグラフである。第7図は第6図において示されるヒトTNFとMJ-841細胞受容タンパクとの特異的結合についてのスキヤッチャードプロット解析結果を示すグラフである。第8図はウサギ生理活性ポリペプチドをコードするDNAを各々含有するプラスミドインサートの制限酵素地図である。第9図は従来のウサギ生理活性ポリペプチドをコードする組換DNA (pTNF-lac-1)の調製方法を示すフローシートである。第10図はウサギ生理活性ポリペプチドをコートするもう一つの組換DNA (pTNF-lac-UV5-1)の調製方法を示すフローシートである。第11図はヒト生理活性ポリペプチドの遺伝子を含有するプラスミドの一部分の制限酵素地図である。第12図はウサギ生理活性ポリペプチドの遺伝子を含有するプラスミドの一部分の制限酵素地図である。第13図はヒト生理活性ポ

リペプチドをコードする組換DNA (pHTNF-lacUV5-1)の調製方法を示すフローシートである。第14図はヒト生理活性ポリペプチドをコードするもう一つの組換DNA (pHTNF-lacUV5-2)の調製方法を示すフローシートである。

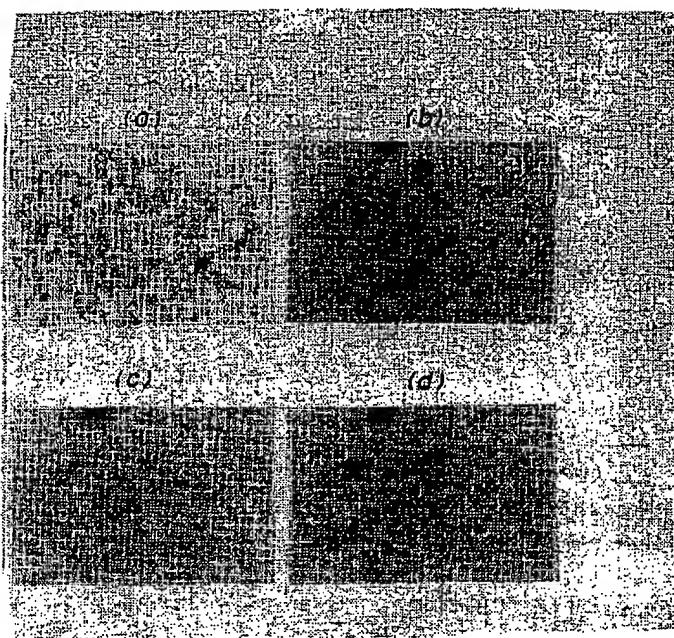
特許出願人 旭化成工業株式会社

図面の净書(内容に変更なし)

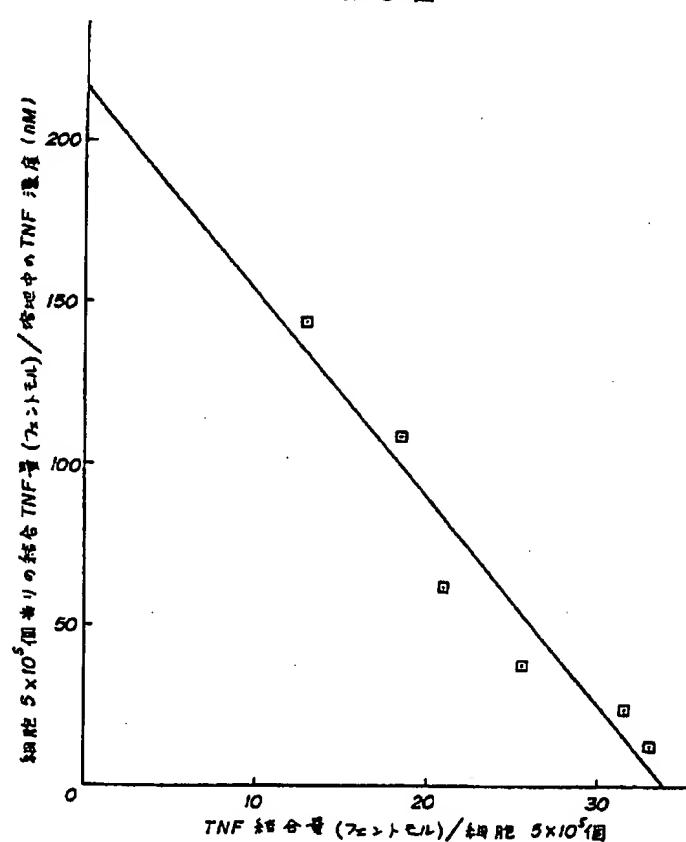
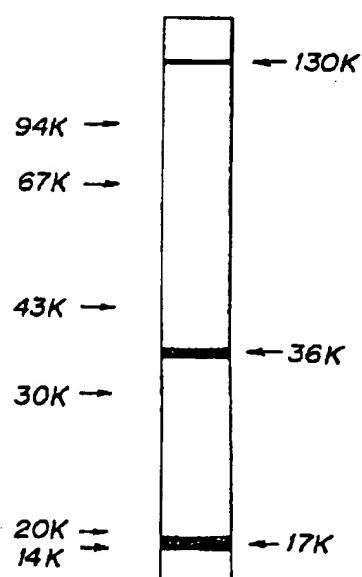
第2図



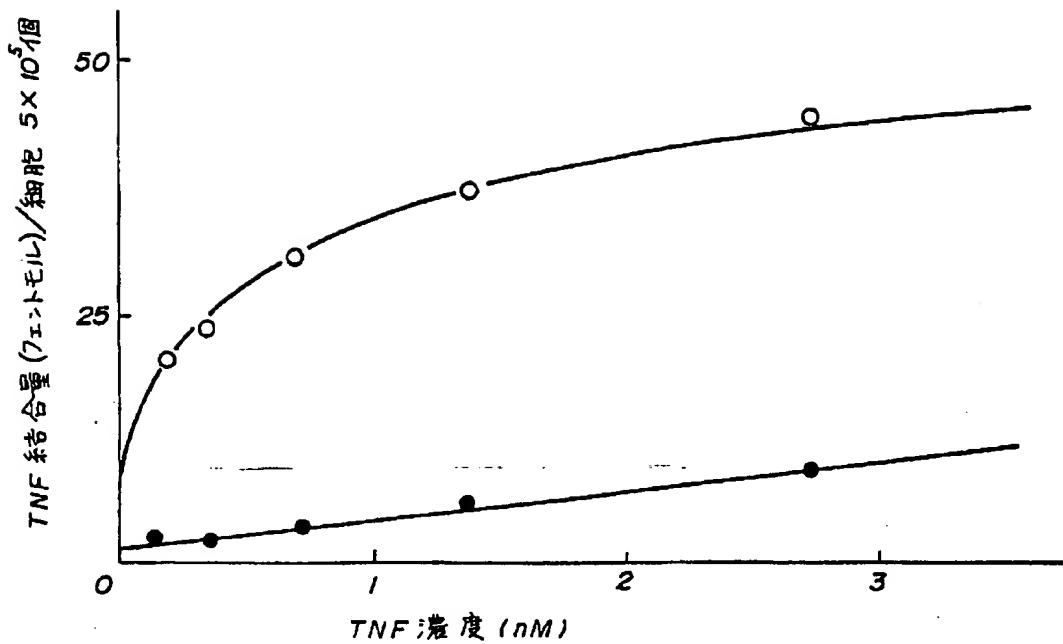
第1図



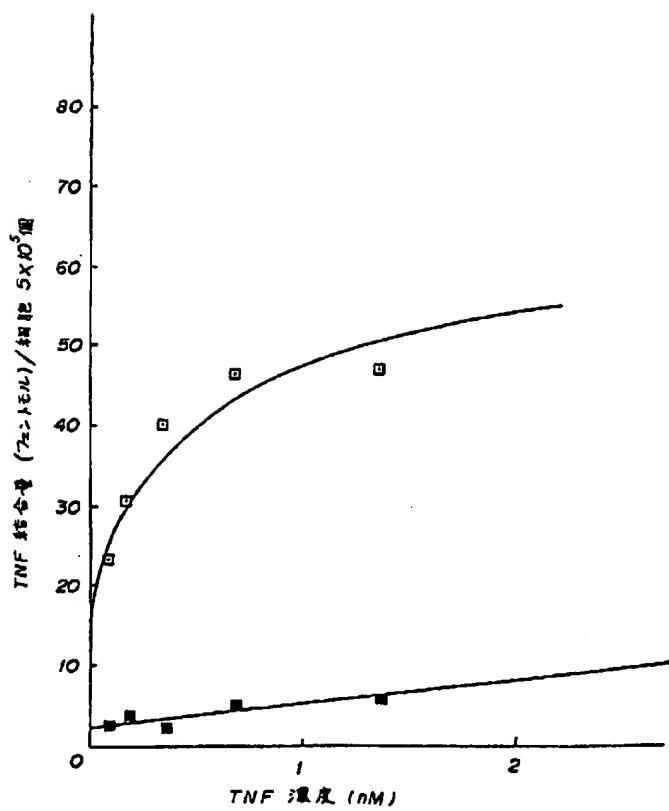
第3図



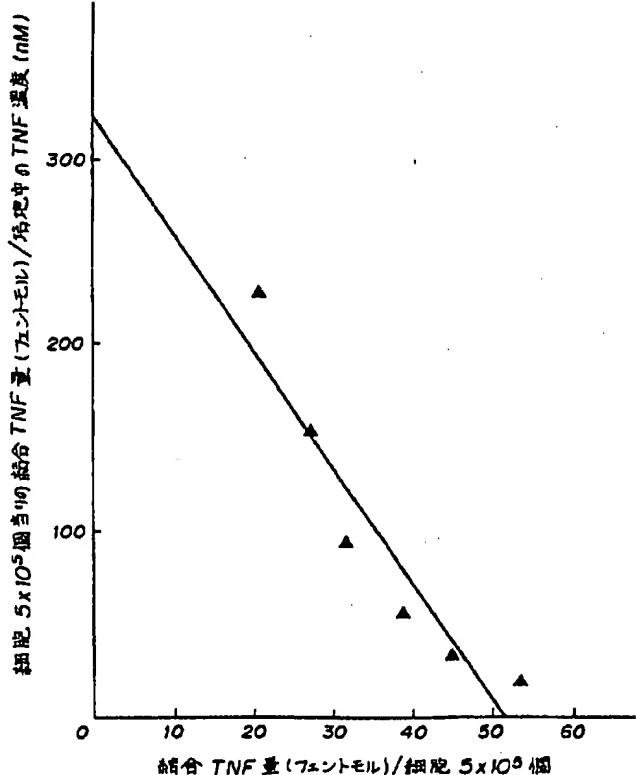
第4図



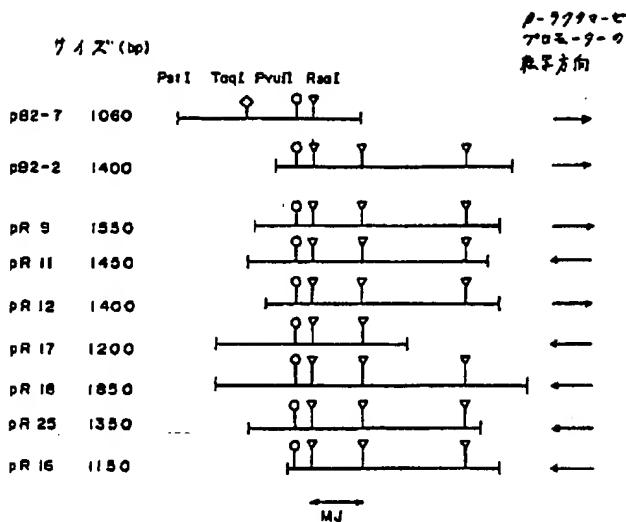
第6図



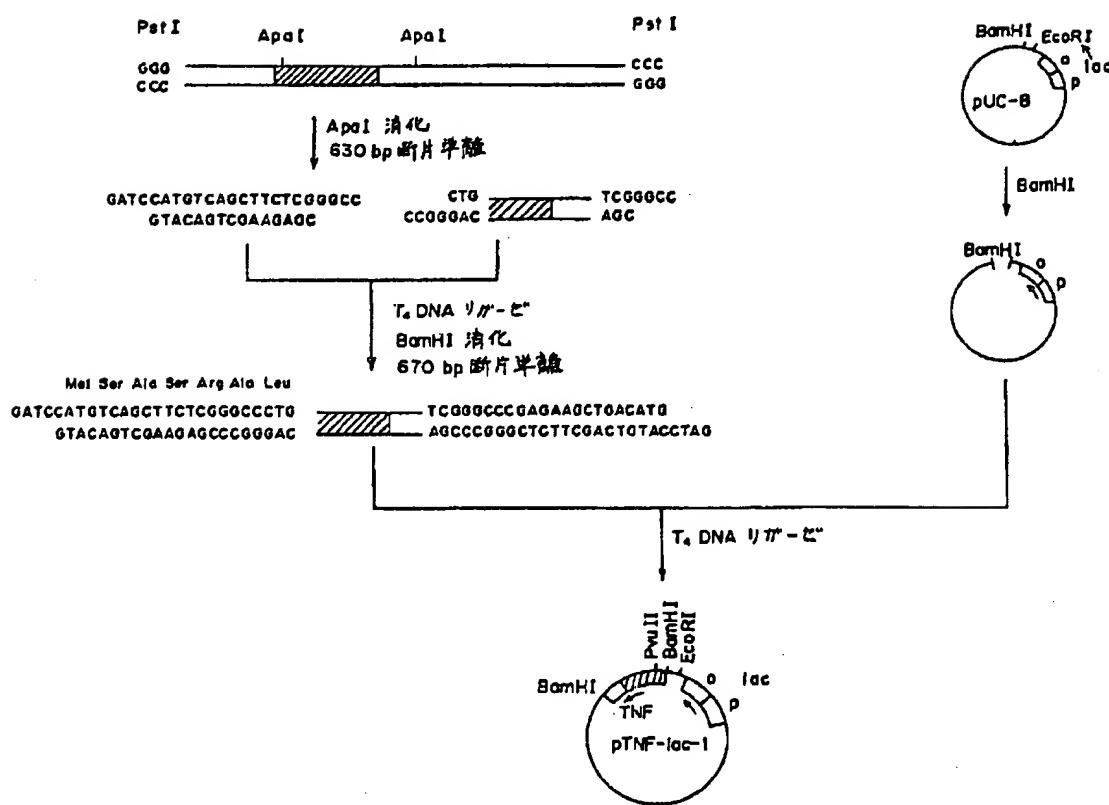
第7図



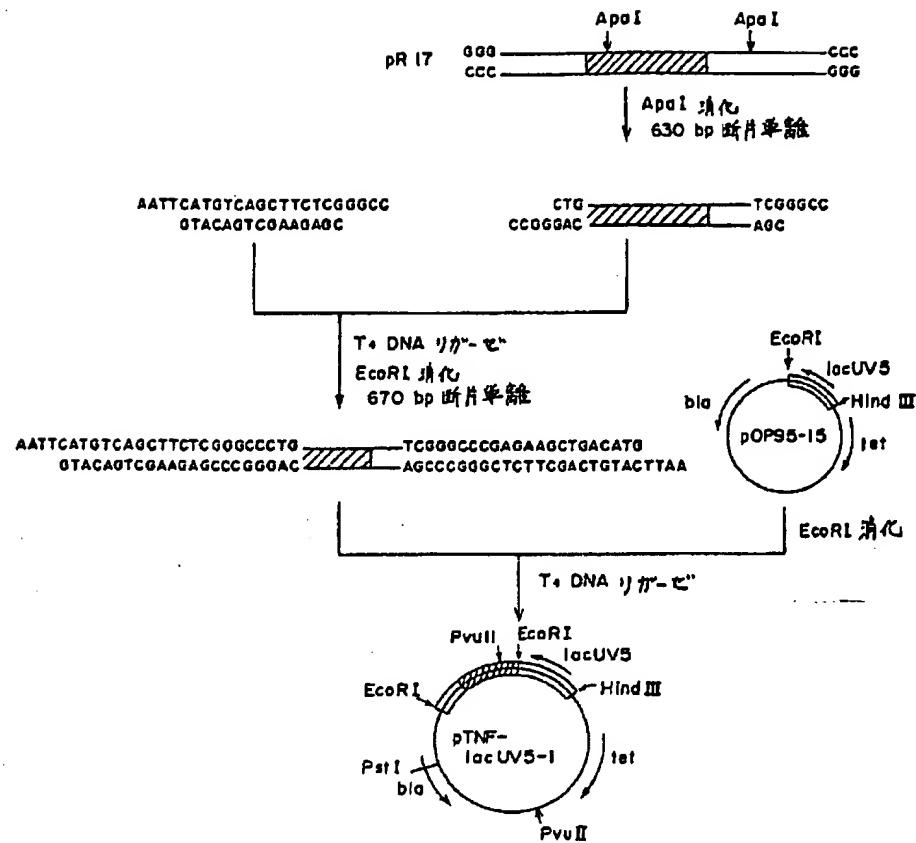
第8図



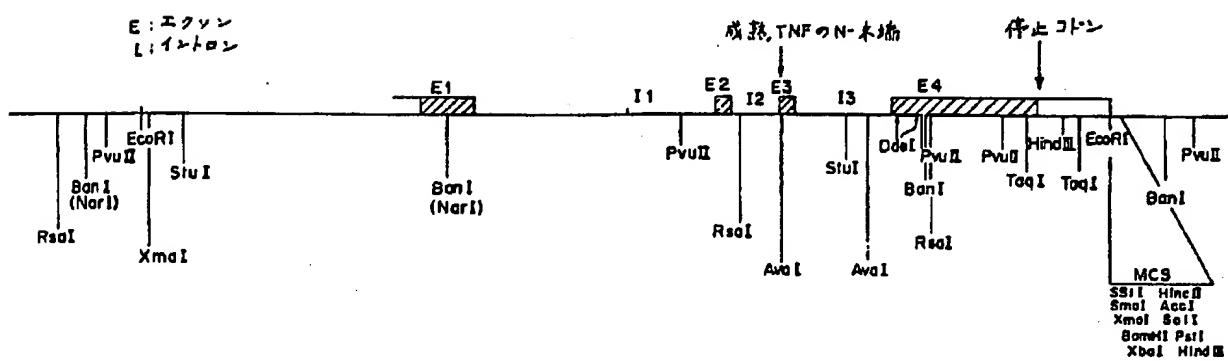
第9図



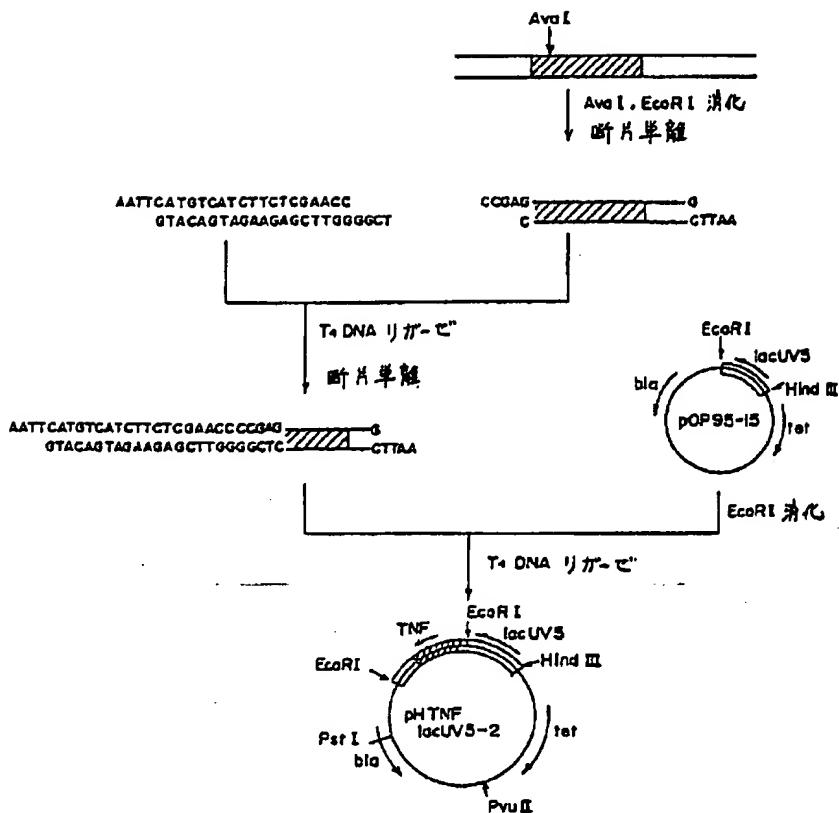
第10回



第 11 圖



第14図



手 続 補 正 書 (方式)

昭和60年10月22日

特許庁長官　宇賀道郎殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第136729号

2. 発明の名称

生理活性物質の受容タンパク

3. 補正をする者

事件との関係　特許出願人

住所　〒530

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

名称 (003) 旭化成工業株式会社

代表取締役社長　世古真臣



4. 補正命令の日付

昭和60年9月24日(発送日)

5. 補正の対象

図面

6. 補正の内容

別紙の通り

△△△△△